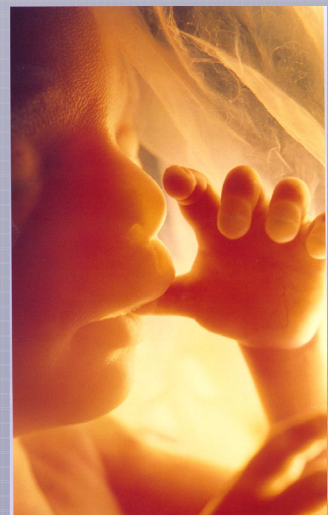


# L'ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL DURANT EL DESENVOLUPAMENT HUMÀ: MECANISMES DE MORT CEL·LULAR I EXPRESSIÓ DE GENS I PROTEÏNES INVOLUCRADES EN LA MALALTIA

Carolina Soler Botija  
Departament de Genètica  
Universitat de Barcelona





**L'ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL DURANT EL DESENVOLUPAMENT HUMÀ:  
MECANISMES DE MORT CEL·LULAR I EXPRESSIÓ DE GENS I PROTEÏNES  
INVOLUCRADES EN LA MALALTIA**

Memòria presentada per la Carolina Soler Botija  
per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques

Barcelona, 2003

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Eduardo F Tizzano  
al Servei de Genètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.  
Programa de Genètica, bienni 1998-2000. Tutor: Dr. Daniel Grinberg.

Dr. Eduardo F Tizzano  
Director

Dr. Daniel Grinberg  
Tutor

Carolina Soler Botija  
Doctoranda





*A tots aquells que no van poder arribar a “ésser” ....i sobretot, als meus pares.*



## AGRAÏMENTS

Ja hi som! Ja he arribat a un dels punts més delicats d'aquest treball, i és el d'intentar recordar tota aquella gent que, de manera voluntària o sense saber-ho, han contribuït a que aquesta tesi es fes realitat. Em venen a la memòria tota una llista de noms que no s'acaba mai, i no m'agradaria oblidar-me'n cap. He preferit anomenar el mínim de gent possible, així que si no veieu el vostre nom en aquesta pàgina, no us ofeneu, sabeu que us ho agraeixo amb sinceritat.

En primer lloc, voldria donar les gràcies al Dr. Tizzano per haver-me guiat en la meva formació com a investigadora. Sempre recordaré les infinites hores passades davant del microscopi, i les reunions al “bolichito” discutint els resultats i de vegades “boludeando”. Has aconseguit que no perdi la il·lusió per la investigació.

Gràcies també a la Dra. Baiget, cap del Servei de Genètica de l'Hospital de Sant Pau, per haver-me donat l'oportunitat de treballar en allò que més m'agrada, i de conèixer uns companys fantàstics, i fins i tot alguns bons amics. Ja us enyoro...

No vull oblidar-me de tota aquella gent dels diferents departaments de l'Hospital de Sant Pau, que m'han donat suport a l'hora de resoldre problemes tècnics i que m'han obert les portes del seu laboratori amb un somriure. Entre aquests, m'agradaria destacar els Departaments d'Anatomia Patològica, Neurologia Experimental, Immunologia, Trombofilia, Mediadors de la Inflamació i Hematologia. A tots, mil gràcies.

Tinc un record molt especial també, de tot l'equip del Dr. Isidre Ferrer i d'ell mateix. Gràcies per tot el que m'heu ensenyat i per fer-me sentir com a casa quan tan sols estava de passada.

Gràcies també a tots els pacients i familiars per no perdre l'esperança i lluitar per vèncer la malaltia.

Estic agraïda també a la Fundació Marató de TV3 i a tota la aquella gent que, amb la seva trucada, van contribuir a que es continués la recerca en les malalties neurodegeneratives, i també gràcies al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS).

Gràcies a les Dres. Judit Melki i Carmen Cifuentes-Díaz de l'INSERM, per les seves idees i comentaris que tan han ajudat a millorar aquests treballs. I a la Dra. Folip per la seva desinteressada col·laboració.

Als meus amics i familiars, per tolerar que la meva vida social s'hagi reduït a zero durant els últims mesos i seguir al meu costat.

I tu Pau, ja ho saps... no tinc paraules.





# ABREVIATURES

AA	Aminoàcids
ACh	<i>Acetylcholine</i>
AChE	<i>Acetylcholinesterase</i>
AChR	<i>Acetylcholine receptor</i>
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
AME	Atròfia Muscular Espinal
Apaf-1	<i>Apoptosis Protease Activating Factor-1</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i>
BH	<i>Homol/heterodimerization domain</i>
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>Bobine Albumine Serum</i>
°C	Graus centígrads
cAMP	<i>cyclic Adenosine Monophosphate</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChAT	<i>Choline acetyltransferase</i>
CK	<i>Creatine Kinase</i>
CRE	<i>cAMP-Responsive Element</i>
CREB	<i>Cre-Binding Protein</i>
CSE	<i>Cholinergic Specific Elements</i>
CT-1	Cardiotrofina-1
DAB	Diaminobencidina
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> Àcid desoxiribonucleic
dp103	<i>putative DEAD-box helicase</i>
E2	transactivador nuclear (del virus del papiloma)
EBNA	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>
ESE	<i>Exon Splicing Enhancer</i>
FBP	<i>FUSE-Binding Protein</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FL-SMN	<i>full-length SMN</i>
FUSE	<i>Far Upstream Element</i>
GIP1	<i>Gemin3 Interacting Protein</i>
gry-rbp	<i>glycine-arginine-tyrosine-rich RNA-binding protein</i>
h	hores
HCSMA	<i>Hereditary Canine Spinal Muscular Atrophy</i>
hnRNP	<i>heterogenous nuclear Ribonucleoprotein</i>
HSA	<i>Human <math>\alpha</math>-Skeletal Actin</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factors</i>
IRE	<i>Interferon Regulatory Element</i>

ISEL	<i>In Situ End-Labeling</i>
kb	kilobase
kDa	kilodalton
mdf	<i>muscle deficient mouse</i>
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
min	minuts
μl	microlitres
ml	mil·lilitres
μM	micromolar
mM	mil·limolar
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
N-Oct-3	<i>Neuronal-Octamer transcription factor-3</i>
NAIP	<i>Neural Apoptosis Inhibitory Protein</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NM	Neurones Motores
NSE	<i>Neuron Specific Enolase</i>
PC12	Línia cel·lular de feocromocitoma de rata
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pM	Picomolar
pmn	<i>progressive motor neuropathy</i>
PRMT5	<i>type II arginine methyltransferase</i>
Rat-1	Línia cel·lular de fibroblasts de rata
RG	Domini ric en arginina i glicina
R2-PPP4c	<i>Regulatory subunit 2-Protein phosphatase 4</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SERF1	<i>Small EDRK-Rich Factor</i>
SIP1	<i>SMN Interacting Protein 1</i>
SMARD	<i>Spinal Muscular Atrophy Respiratory Disease</i>
SMN	<i>Survival Motor Neuron</i>
SMN1 (SMNt)	Còpia telomèrica de SMN
SMN2 (SMNc)	Còpia centromèrica de SMN
snRNPs	<i>small nuclear Ribonucleoprotein</i>
SSCP	<i>Single Stranded Conformation Polymorphism</i>
SV	<i>Sindbis virus</i>
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i>
TFIIH	<i>Transcription Factor IIH</i>
TM	Domini transmembrana
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling</i>
U	Unitats
UN	Unió neuromuscular
YY1	<i>Yin Yang 1 transcription factor</i>
ZPR1	<i>Zinc-finger protein</i>

# Índex



ÍNDEX .....	1
INTRODUCCIÓ .....	5
A. LA MALALTIA: Atròfia Muscular Espinal .....	7
1. INTRODUCCIÓ .....	7
2. ASPECTES CLÍNICS .....	7
3. LESIÓ NEURONAL I MUSCULAR .....	9
4. MÈTODES DE DIAGNÒSTIC .....	11
5. GENÈTICA MOLECULAR DE L'AME .....	11
6. DEL GEN A LA PROTEÏNA: EXPRESSIÓ I FUNCIO DE LA PROTEÏNA SMN..	19
7. MODELS ANIMALS .....	26
8. POSSIBLES TERÀPIES .....	35
B. LA MEDUL·LA, EL MÚSCUL I LA UNIO NEUROMUSCULAR DURANT EL DESENVOLUPAMENT HUMÀ .....	37
1. DESENVOLUPAMENT DE LA MEDUL·LA ESPINAL.....	37
2. DESENVOLUPAMENT DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC: Extremitats .....	40
3. LA UNIO NEUROMUSCULAR.....	43
4. EL NEUROTRANSMISOR: ACETILCOLINA .....	44
5. LA COLINA ACETILTRANSFERASA (ChAT).....	47
6. FUNCIONS: EL REFLEX ELEMENTAL .....	48
C. LA MORT CEL·LULAR .....	50
1. TIPUS DE MORT CEL·LULAR .....	50
2. MECANISMES D'APOPTOSI.....	52
3. MORT CEL·LULAR DURANT EL DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL.....	53
4. LA FAMÍLIA BCL-2 .....	54
D. L'AME I L'APOPTOSI .....	59
OBJECTIUS.....	63
RESULTATS.....	67
TREBALL 1: Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord .....	69
ANNEX DEL TREBALL 1: Estudi comparatiu de morfologia i mort cel·lular al múscul esquelètic de les extremitats superiors i inferiors de fetus control i AME .....	83
TREBALL 2: Down-regulation of Bcl-2 proteins in type I SMA motor neurons during fetal development .....	87
ANNEX DEL TREBALL 2: Estudi de proteïnes de mort cel·lular a la medul·la espinal i al múscul esquelètic de fetus control i AME .....	97

TREBALL 3: Choline acetyltransferase expression in fetal Spinal Muscular Atrophy spinal cord.....	101
TREBALL 4: Implications of SMN2 expression in Spinal Muscular Atrophy pathogenesis during development .....	119
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	139
Mort neuronal .....	141
Funció colinèrgica.....	148
Desenvolupament muscular .....	150
Expressió de SMN2 .....	152
Conclusió general.....	155
<b>CONCLUSIONS</b> .....	157
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	161

# Introducció





# A. LA MALALTIA: Atròfia Muscular Espinal

## 1. INTRODUCCIÓ

L'Atròfia Muscular Espinal (AME) comprèn a un conjunt heterogeni de malalties caracteritzades per la degeneració i pèrdua de les neurones motores de la banya anterior de la medul·la espinal, comportant una debilitat proximal i simètrica i una atròfia progressiva dels grups musculars. La majoria dels casos presenten una herència autosòmica recessiva, encara que es coneixen famílies amb herència dominant. Aquesta malaltia neuromuscular té una incidència estimada d'1 de cada 6.000-10.000 naixements, amb una freqüència de portadors d'1/40-1/60 (revisat a Emery AE, 1971; McAndrew PE *al.*, 1997). Ocupa el segon lloc de les malalties autosòmiques recessives greus després de la fibrosi quística (Pearn J, 1978).

A l'any 1891, el neuròleg austríac Guido Werdnig va descriure dos germans amb AME proximal. Dos anys més tard, Johan Hoffmann, d'Alemanya i també neuròleg, va augmentar el nombre de casos amb quatre pacients de dues famílies no emparentades. Els símptomes apareixien a finals del primer any de vida. A mitjans dels anys 50, Kugelberg i Welander van descriure 12 pacients als que la malaltia se'ls començava a manifestar entre els 2 i els 17 anys d'edat. Tots podien continuar caminant uns 8 ó 9 anys després de que apareguessin els primers símptomes. Aquestes diferències en l'edat de l'aparició de la malaltia van portar a que els pacients es classifiquessin en tres grups, en els que també es tindrà en compte la severitat de la clínica. Els tres tipus són: forma aguda tipus I o malaltia de Werdnig-Hoffmann, forma intermèdia tipus II i juvenil tipus III o malaltia de Kugelberg-Welander (Pearn J, 1990).

## 2. ASPECTES CLÍNICS

La **forma aguda tipus I** (Werdnig-Hoffmann) es caracteritza per una debilitat muscular severa i generalitzada amb flacciditat i hipotonia. Els símptomes es presenten en el moment del naixement o abans del sisè mes de vida. En aquest tipus ens trobem amb nadons poc actius que van mostrant signes de retard motor, essent més profunds en els músculs de la cintura pelviana i de les cames, que en la musculatura de la cintura escapular i dels braços. A

les extremitats es presenta major debilitat proximal que distal. Els músculs de la cara també estan afectats, no mostrant expressivitat i amb tendència del cap a caure cap a un costat. No presenten reflexes i la presència de fibril·lacions i de potencials de denervació positius espontanis contribueixen al diagnòstic, encara que és important confirmar-lo mitjançant una biòpsia muscular. En aquesta s'observen anomalies en el nombre i grandària de les fibres musculars, essent atrofiques o hipertròfiques. La progressió clínica és relativament ràpida, produint-se la mort entre els 7 i 18 mesos degut a trastorns respiratoris. Tenen dificultats en la ventilació i es donen infeccions a les vies respiratòries degut a l'aspiració de menjar. Existeixen casos en que la simptomatologia es presenta en el moment de néixer, amb una severa debilitat muscular, comportant la mort molt poc després del naixement. Alguns autors anomenen a aquest tipus **AME tipus 0** (MacLeod MJ *et al.*, 1999).

La **forma intermèdia tipus II** acostuma a aparèixer entre el sisè i el dotzè mes de vida. El curs clínic de la malaltia està marcat per períodes d'aturada en la progressió clínica. En un principi s'observa un desenvolupament motor normal i fins i tot a vegades es troben reflexes, però abans dels dos anys generalment desapareixen. Presenten una progressió de la malaltia més lenta que en el tipus I. De qualsevol manera, menys del 25% dels nens poden mantenir-se asseguts pels seus propis mitjans, rarament arriben a graponar i mai caminen. Alguns autors consideren que no existeix una forma intermèdia de la malaltia sinó que és una transició gradual entre el tipus I i el III. Altres engloben la II i la III com atròfia muscular espinal crònica.

La forma **juvenil tipus III o malaltia de Kugelberg-Welander** (Kugelberg E i Welander L, 1956) presenta una gran variabilitat pel que fa a l'edat d'aparició, oscil·lant entre els primers anys de vida i els trenta anys. Comença observant-se dificultats en la locomoció i incapacitat de córrer i aixecar-se de les nombroses caigudes. En un principi, la debilitat muscular s'inicia en la part superior de les cames i la cintura pelviana, estenent-se a la cintura escapular i a la musculatura proximal dels braços. Poc a poc, s'aniran afectant els músculs del coll, la musculatura distal i en ocasions els músculs facials i la llengua (innervats per nuclis bulbars). S'observa una arreflexia generalitzada a la meitat dels pacients i en la resta no existeixen reflexes o són dèbils, especialment a les extremitats inferiors. També La progressió de la malaltia presenta variabilitat individual, de tal manera que alguns pacients no arriben a caminar mai i d'altres ho fan durant varies dècades. Aproximadament 1/4 dels pacients presenta hipertròfia dels panxells i un augment de les creatin cinases sèriques, senyals similars als que es donen a les distròfies musculars de Duchenne o de Becker (Pearn J, 1990).

Existeix una darrera forma descrita, que s'anomena **tipus IV o forma adulta**. Els símptomes apareixen a l'adult generalment després dels 30 anys, presentant una progressió relativament lenta.

**Taula 1.** Classificació de l'AME en tipus I, II i III (Munsat TL, 1991).

Tipus	Aparició (mesos)	Evolució	Mort (anys)
I (Severa)	< 6	No seuen	< 2
II (Intermèdia)	6-18	Seuen però no assoleixen bipedestació	> 2
III (Juvenil)	> 18	Assoleixen bipedestació i caminen	Edat adulta

Existeixen altres formes d'AME descrites que es classifiquen segons la presentació clínica i el tipus de transmissió. Algunes d'elles són l'amiotrofia espinal bulbar o malaltia de Kennedy, l'atròfia espinal distal, les AME associades a artrogriposi, l'atròfia espinal associada a estrès respiratori (SMARD) també coneguda com AME diafragmàtica, l'atròfia espinal escapulo-peroneal, l'atròfia espinal facio-escapulo-humeral, les neuropaties motrius segmentàries i les neuropaties motrius associades a una afectació neurològica central (atròfia olivopontocerebelosa) (Pearn J, 1990).

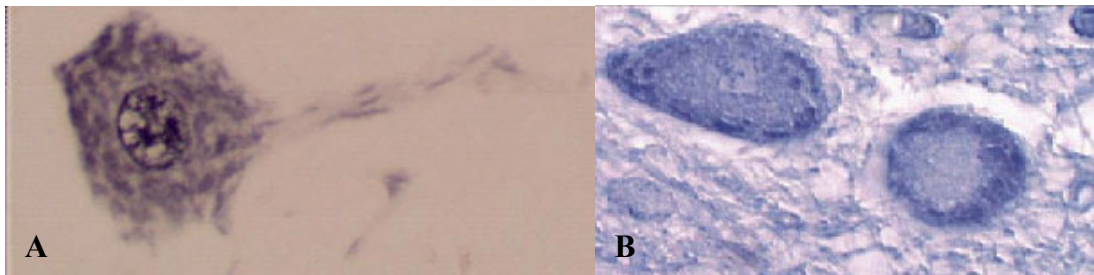
### 3. LESIÓ NEURONAL I MUSCULAR

#### Aspectes neuropatològics

En la forma aguda tipus I de l'AME, el canvi més important que s'observa és la degeneració de les cèl·lules de la banya anterior de la medul·la espinal. Hi ha varis estadis de degeneració. En els estadis primerencs, els nuclis es desplacen de la seva posició central, els cossos de Nissl també es mouen cap a la perifèria reduint el seu nombre i mida. El citoplasma s'expandeix prenent una aparença col·loïdal homogènia. Poden aparèixer petits agregats de possibles orgànuls en degeneració cap al centre de la cèl·lula. Eventualment, es deixen d'observar els cossos de Nissl, les neurofibril·les intracel·lulars desapareixen i el centre de la cèl·lula és ocupat per una massa argiròfila fosca. Al voltant d'aquestes neurones podem trobar cèl·lules de la glia. Finalment, les restes neuronals desapareixen completament deixant un espai buit (neuronofàgia). En els últims estadis, la cèl·lula té un aspecte globular amb una tinció uniforme. Sovint a aquestes cèl·lules se les anomena cèl·lules fantasmes. Els canvis s'observen de manera simètrica a la majoria dels nivells de la medul·la espinal. Els mateixos canvis es veuen freqüentment als nuclis vestibulars facials i laterals, a l'hipoglòs, al oculomotor i d'altres. Es pot observar també una gliosi fibril·lar lleu en la matèria grisa afectada. Aquesta distribució de la lesió no es troba sempre a pacients que moren en les etapes inicials de la malaltia. Hi ha hagut casos de mort als 20 dies del naixement en que la degeneració de les cèl·lules de la banya anterior sols es va donar a les regions cervical i toràcica.

En la malaltia de Werdnig-Hoffmann hi ha una atròfia de les arrels anteriors. Les fibres mielinitzades es perden selectivament i els axons de la porció proximal de les arrels anteriors degeneren.

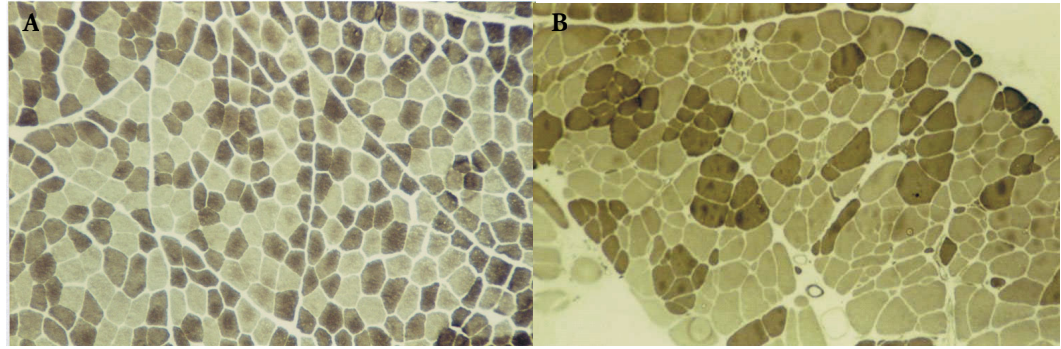
Encara que no es presentin alteracions sensorials, les cèl·lules dels ganglis esplinals també patiran cromatòlisi i es veuran reduïdes en nombre. Ocasionalment, podem trobar cromatòlisi a la columna de Clarke i al tàlem, especialment al nucli lateral. Hi ha una reducció del nombre de neurones, apareixen cossos fantasma i neuronofagia als nuclis talàmics posteroventrals (Fidzianska-Dolot A *et al.*, 1984; Pearn J, 1990).



**Figura 1. A.** Neurona motora normal d'un infant de 5 mesos d'edat. Immunoreacció TUNEL i anti-Hu (400x augments). **B.** Neurona motora en degeneració d'un infant de 9 mesos d'edat que va morir d'una AME tipus I. Tècnica de TUNEL (600x augments).

## Lesió muscular

Un dels trets principals del múscul esquelètic i de la llengua als individus afectats per la malaltia és la presència de grups de fibres musculars amb un diàmetre inferior a 5  $\mu\text{m}$ . S'observen així els canvis característics d'un procés de denervació, en el que les fibres musculars atrofiques es troben reagrupades en fascicles i també se'n troben d'hipertròfiques (Mastaglia FL *et al.*, 1971). S'observen també fibres angulars disposades a l'atzar entre les de mida normal. Les fibres musculars atrofiques agrupades en fascicles són, la majoria de vegades, del mateix tipus ATPàsic. Aquestes anomalies són degudes a un procés de denervació i posterior innervació per neurones motores veïnes intactes. D'aquesta manera, totes les fibres d'una àrea determinada passaran a ser innervades per la mateixa neurona motora, el que vol dir que seran del mateix tipus (Engel WK, 1970). Podem trobar també regions en les que hi ha fibres comparativament normals amb d'altres atrofiques. Tot i això, la majoria de les fibres conserven la seva estriació transversal. Una altra característica que cal destacar, és el fet que el diafragma no presenti cap alteració. Tan sols en alguns casos hi ha presència de fibres amb un diàmetre superior a les 50  $\mu\text{m}$  (Hausmanowa-Petrusewicz I i Fidzianska A, 1974).



**Figura 2.** Talls transversals de biòpsies musculars d'un individu control (A) i d'un afecte d'AME (B). ATPasa 9,4.

## 4. MÈTODES DE DIAGNÒSTIC

Per al diagnòstic de l'AME es segueixen les bases definides el 1991 pel Consorci Internacional de les AME (Munsat TL, 1991). Un dels mètodes més eficaços de diagnòstic és l'electromiografia. Et permet estudiar l'activitat elèctrica de les fibres musculars i proporciona informació de l'estructura i la funció de la unitat motora. El patró característic de denervació comporta un augment en la duració i l'amplitud del potencial d'acció de la unitat motora.

Les biòpsies musculars ens mostraran el patró histològic característic anteriorment anomenat. Tot i que avui en dia no s'utilitza tant degut a la introducció del diagnòstic molecular, que s'explicarà més endavant, permet confirmar el diagnòstic de l'AME dins de les formes atípiques.

Per últim, l'estudi de la velocitat de conducció nerviosa motriu permet la distinció entre l'AME i les neuropaties perifèriques degut a la normalitat en la velocitat de conducció en les primeres.

## 5. GENÈTICA MOLECULAR DE L'AME

### El locus SMA

L'any 1990, les anàlisis de lligament genètic van mapar els tipus I, II i III d'AME al cromosoma 5q11.2-13.3 (Brzustowicz LM *et al.*, 1990; Melki J *et al.*, 1990a, b). Un estudi més acurat va permetre obtenir el mapa físic del *locus* responsable de la malaltia. Aquesta és

una regió complexa que conté una duplicació invertida de més de 500 Kb, amb seqüències múltiples repetides. Tot això fa que aquesta zona sigui propensa a patir delecions a gran escala, és a dir, és una regió inestable (Melki J *et al.*, 1994). S'hi han identificat quatre gens:

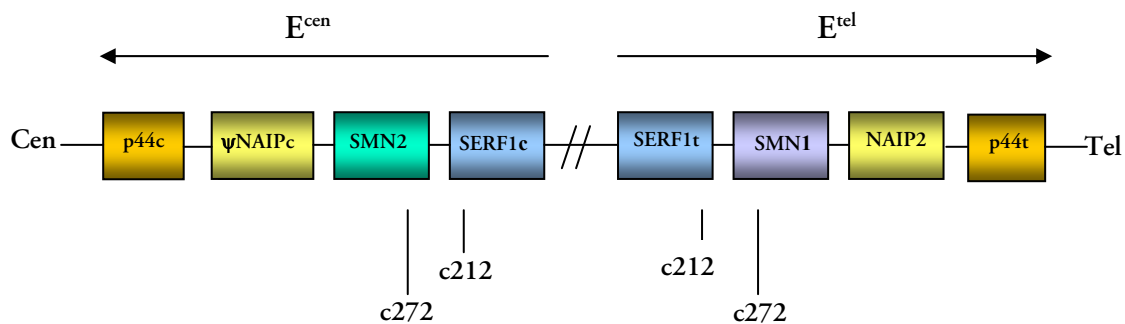
-Gen *SMN* (*Survival Motor Neuron*) (Lefebvre S *et al.*, 1995).

-Gen *NAIP* (*Neural Apoptosis Inhibitory Protein*) (Roy N *et al.*, 1995).

-Gen *p44* que codifica per una subunitat del factor de transcripció basal TFIIF (Bürglen L *et al.*, 1997; Carter TA *et al.*, 1997).

-Gen *SERF1* (*Small EDRK-Rich Factor*) de funció desconeguda (Scharf JM *et al.*, 1998).

Aquests quatre gens estan duplicats, obtenint-se doncs una còpia telomèrica i una altra centromèrica (Figura 3).



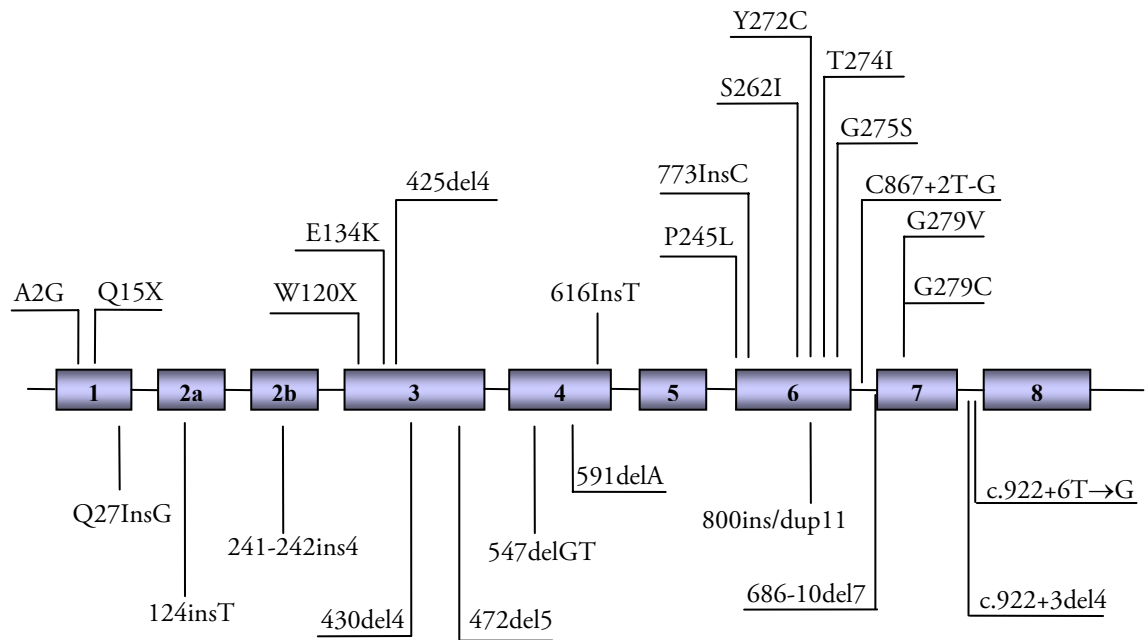
**Figura 3.** Esquema del *locus* SMA mostrant la posició dels gens *p44*, *NAIP*, *SMN* i *SERF1*.  $\psi NAIPc$ : Pseudogèn.  $E^{cen}$  i  $E^{tel}$ : Elements repetits.  $c212$  i  $c272$ : Marcadors (modificat de Schmalbruch H i Haase G, 2001).

Tot i que als pacients es poden detectar delecions a qualsevol d'aquests gens, les tres formes d'AME estan causades per mutacions en el gen *SMN* telomèric, anomenat *SMN1* (*SMNt*), que es perdrà per deleció o per conversió gènica, o patirà mutacions puntuals.

## El gen *SMN*

El gen *SMN1* té unes 20 Kb, conté 9 exons i és gairebé idèntic a la seva còpia centromèrica *SMN2* (*SMNc*). La còpia telomèrica de *SMN* presenta delecions als exons 7 i 8 aproximadament en un 90% dels afectats, independentment de la gravetat clínica. S'ha vist també que, en un 5% dels afectats es detecta tan sols deleció de l'exó 7. Posteriorment s'ha

demostrat que en aquests casos, l'exó 7 ha estat reemplaçat pel seu homòleg centromèric, formant-se així gens híbrids *SMN1-SMN2* degut a fenòmens de deleció o conversió gènica (Cuscó I *et al.*, 2001). La resta de pacients sense una deleció major presenten mutacions puntuals intragèniques (Figura 4) (Lefebvre S *et al.*, 1995; Bussaglia E *et al.*, 1995; revisat per Wirth B, 2000).



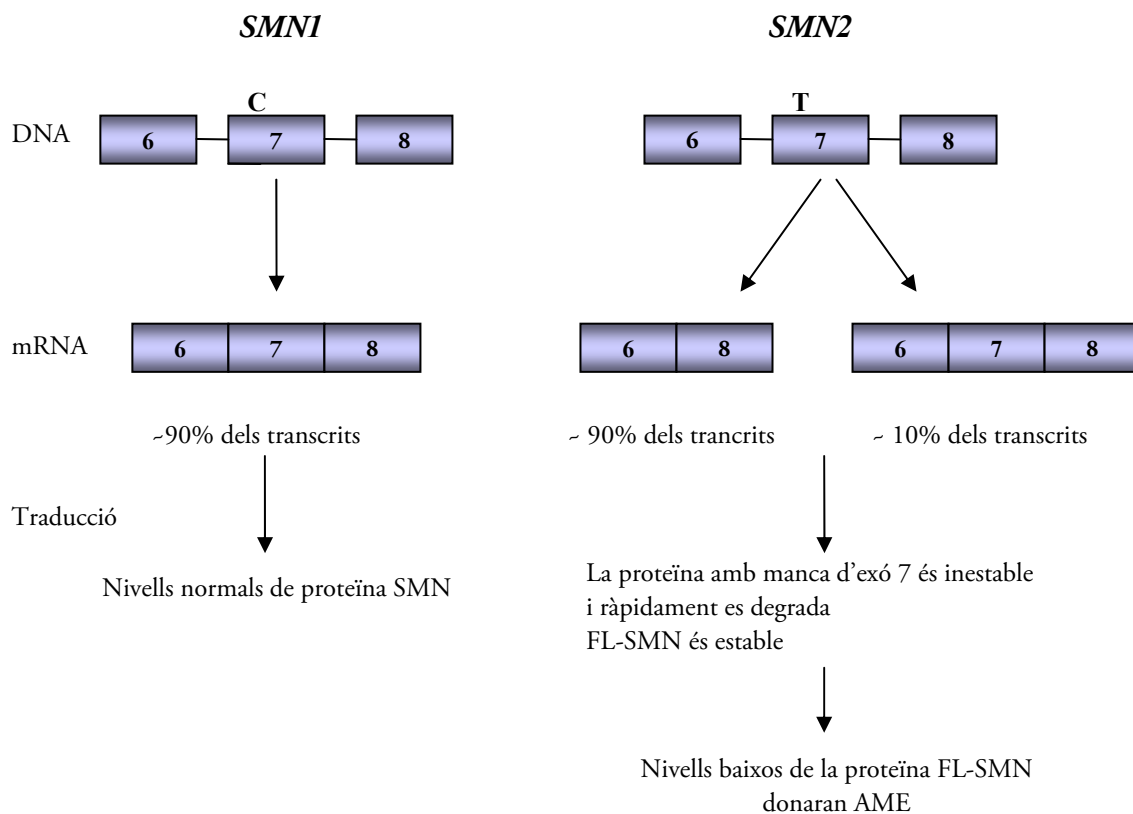
**Figura 4.** Distribució topogràfica de les mutacions puntuals descrites al gen *SMN1*. Es poden trobar insercions, microdeleccions i duplicacions (modificat de Tizzano EF i Baiget M, 2000 i Wirth B, 2000).

Encara no s'ha trobat cap deleció homozigota dels dos gens, *SMN1* i *SMN2*, el que fa pensar que aquest genotip comporta una letalitat embrionària. La còpia centromèrica de *SMN* és present en tots els pacients, tot i que manca en un 5-10% dels individus control (Lefebvre S *et al.*, 1995; revisat per Wirth B, 2000; Rojas-Garcia R *et al.*, 2002). Ens podem preguntar doncs, perquè el gen *SMN2* no compensa la pèrdua del gen *SMN1*?

## Diferències entre *SMN1* i *SMN2*

Entre la còpia telomèrica i la centromèrica del gen *SMN* existeixen unes poques variacions nucleotídiques. Concretament es diferencien per la llargada d'una repetició CA que es troba a la regió 5'*upstream*, no comportant una variació en l'activitat del promotor (Monani UR *et al.*, 1999b; Echaniz-Laguna A *et al.*, 1999). També presenten substitució de

5 nucleòtids, però tan sols un d'ells es troba a una regió codificant. Aquest nucleòtid es troba a l'exó 7 (posició +6) no alterant la seqüència d'aminoàcids però sí essent el responsable del freqüent *splicing* alternatiu d'aquest exó en el gen *SMN2*. A més a més, s'ha identificat un pacient amb AME que presenta una alteració en el lloc donador de l'*splicing* de l'exó 7, alterant així la seva incorporació en el mRNA (Lorson CL *et al.*, 1999) (Figura 5). Això indica que la diferència crítica entre *SMN1* i *SMN2* és la substitució d'un sol nucleòtid que causarà l'alteració de l'activitat d'un *Exon Splicing Enhancer* (ESE) a l'exó 7, de manera que *SMN2* produirà nivells elevats de transcrits sense l'exó 7 ( $\Delta 7$ ) (Lorson CL i Androphy EJ, 2000). Això donarà lloc a una proteïna inestable i amb poca capacitat d'oligomerització que es degrada ràpidament. Els pacients produiran doncs, nivells reduïts de la proteïna SMN, encara que els tipus II i III en tindran més que els de tipus I (Coovert D *et al.*, 1997; Lefebvre S *et al.*, 1997). Per tant, es pot dir que una de les característiques de l'AME és la disminució de la quantitat de SMN sencer.

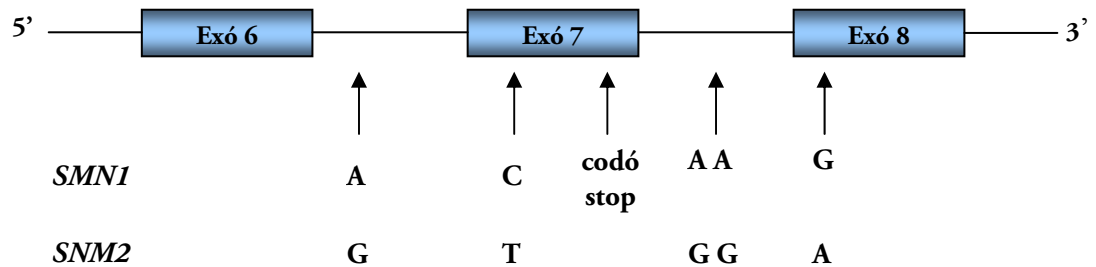


**Figura 5.** Diagrama de la transcripció i translació dels gens *SMN1* i *SMN2* mostrant les diferències entre els dos gens i les bases moleculars de l'AME a pacients. ESE: *Exon Splicing Enhancer*; C: citosina; T: timina; *FL-SMN*: *full-length* SMN (transcrit sencer) (modificat de Monani UR *et al.*, 2000b).



La resta de substitucions es situen dins dels introns o de les seqüències no codificants (Figura 6). Aquestes es distribueixen de la següent manera:

- Intró 6 en posició -45 respecte l'exó 7.
- Dues a l'intró 7 en les posicions +100 i +214 respecte l'exó 7.
- Exó 8, no codificant, en posició +233 respecte l'exó 7.



**Figura 6.** Diferències nucleotídiques entre *SMN1* i *SMN2* (Lefebvre S *et al.*, 1995; Bürglen L *et al.*, 1996a; Lorson CL *et al.*, 1999; Monani UR *et al.*, 1999a).

## Diagnòstic molecular de l'AME

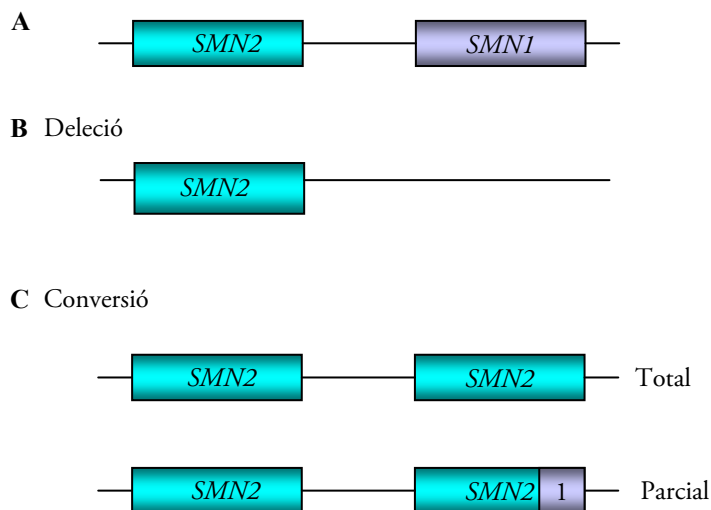
El diagnòstic molecular de l'AME és el mètode més fiable per a la confirmació del diagnòstic clínic o la predicció prenatal de la malaltia. Les tècniques que s'utilitzen es basen en l'anàlisi de SSCP (Lefebvre S *et al.*, 1995) o en una PCR seguida d'una digestió (van der Steege G *et al.*, 1995). El que es farà serà detectar la deleció de l'exó 7 i 8 del gen *SMN*. L'absència d'ambdues còpies del gen *SMN1* és un diagnòstic clar en la majoria de pacients amb AME.

En l'estudi de portadors de familiars de pacients, s'utilitza per una banda un mètode indirecte de detecció, en el que serà necessari tenir DNA de l'afectat a fi i efecte d'identificar els haplotips de risc que segreguen amb la malaltia. L'anàlisi dels marcadors més propers al gen (marcadors C212 i C272) permet fer un diagnòstic per probabilitats. Per altra banda, és possible l'aplicació de mètodes quantitatius, que ens permetran mesurar si la mostra en estudi conté una o dues còpies del gen *SMN1* (revisat per Cuscó I *et al.*, 2002). El mètode quantitatiu també ens permetrà fer un estudi de portadors de la població general. S'ha vist que un 4% dels portadors poden presentar dues còpies del gen *SMN1* a un cromosoma i cap en l'altre (Mc Andrews PE *et al.*, 1997; Wirth B *et al.*, 1999; Scheffer H *et al.*, 2000).

En el cas de trobar-nos davant d'una mutació *de novo* (menys d'un 2 % dels pacients amb AME), el risc de recurrència en membres de la mateixa família pot ser en teoria nul, sempre i quan no hi hagi mosaicisme germinal (Melki J *et al.*, 1994; Capon F *et al.*, 1995; Raclin V *et al.*, 1997; Wirth B *et al.*, 1997).

## Correlació genotip-fenotip

No s'ha establert cap correlació clara entre el genotip i el fenotip a nivell del *locus* *SMN*. S'ha vist que les delecions homozigotes del gen *SMN1*, que poden incloure els gens *NAIP* i *p44*, s'associen a les formes severes de l'AME (tipus I) (Burlet P *et al.*, 1996; Rodrigues NR *et al.*, 1996; Bürglen L *et al.*, 1997; Carter TA *et al.*, 1997). De tota manera, algunes mutacions puntuals en el gen *SMN1* també són responsables de les formes severes; per tant, es pot suggerir que les delecions dels gens *NAIP* i *p44* no estan directament implicades en la severitat de la malaltia. A part de les delecions i mutacions puntuals a *SMN1*, existeix el fenomen de la conversió gènica de *SMN1* a *SMN2*, que es dona majoritàriament a individus tipus III. Pels casos de tipus II es pot pensar que un al·lel està deleccionat i l'altre convertit (Bussaglia E *et al.*, 1995; DiDonato CJ *et al.*, 1997a; revisat per Burghes AH, 1997; Campbell L *et al.*, 1997). Com a resultat, un 5% dels casos AME són gens híbrids *SMN1-SMN2* (Cuscó I *et al.*, 2001) (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama dels al·lells del gen *SMN*. **A.** Al·lells normals. El 5-10% de la població pot tenir el gen *SMN2* deleccionat. **B.** Al·lells amb delecció. **C.** Al·lells amb conversió gènica total (substitució del

gen *SMN1* pel *SMN2*) o parcial (gen híbrid que conserva l'exó 8 del gen *SMN1*). Tan sols s'ha representat un al·lel (modificat de Tizzano EF i Baiget M, 2000).

Per altra banda però, podem trobar variabilitat intrafamiliar, especialment a les formes cròniques (tipus II, III i IV), en les que s'han donat casos de germans asimptomàtics amb una deleció similar del gen *SMN1* a la dels afectats amb l'AME (Hahnen E *et al.*, 1995; Cobben JM *et al.*, 1995; Bussaglia E *et al.*, 1997).

Tot això porta a pensar que podria haver altres gens o factors que modificarien el fenotip de la malaltia, tot i ser el gen *SMN1* determinant d'aquesta. S'han suggerit els gens *SMN2* i *NAIP* com a possibles gens modificadors, entre d'altres.

## Gens modificadors

***SMN2*:** Donat que *SMN2* produeix certa quantitat de proteïna, el nombre de còpies d'aquest gen podria ser determinant en el fenotip de la malaltia. Es van comparar pacients amb diferents graus de la malaltia i es va veure una gran correlació entre el nombre de còpies de *SMN2* i la severitat fenotípica, de manera que les formes més lleus de la malaltia tenien més còpies. En general, els tipus I tenen una o dues còpies i els tipus II i III entre 3 i 6 (McAndrew PE *et al.*, 1997; Campbell L *et al.*, 1997; Feldkötter M *et al.*, 2002). Tot i que això és vàlid per la majoria de casos, hi ha pacients que no presenten aquesta correlació. A més a més, s'han descrit casos de germans amb igual nombre de còpies però amb una variabilitat intrafamiliar pel que fa a la simptomatologia (McAndrew PE *et al.*, 1997; DiDonato CJ *et al.*, 1997b). Tot això suggereix que han d'existir altres gens o factors, a part dels gens *SMN1* i *SMN2*, que determinaran la gravetat de la malaltia. Actuaran directament modificant els nivells d'expressió de SMN o indirectament compensant la pèrdua funcional de la proteïna.

***NAIP (Neural Apoptosis Inhibitory Protein)*:** És un altre dels gens que s'ha proposat com a modificador de la severitat de la malaltia. Al 1996, Liston *et al.* va mostrar l'efecte antiapoptòtic de NAIP i altres membres de la família de proteïnes IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) (Liston P *et al.*, 1996). Van demostrar també que el gen NAIP s'expressava a neurones motores i no a les sensorials. Això concorda amb la teoria de que la proteïna actuaria com a regulador negatiu de l'apoptosi de les neurones motores, i al trobar-se en un baix nivell o manca, contribuiria al desenvolupament del fenotip AME.

*NAIP* es situa a l'extrem 3' de *SMN1*, essent la còpia telomèrica la funcional, i la centromèrica, a la qual li manca l'exó 5, la truncada (Roy N *et al.*, 1995). Té una gran

incidència de deleció conjunta amb el gen *SMN1* als pacients de tipus I (50%), mentre que a les formes cròniques, tan sols un 15-20% dels afectats presenten aquesta deleció. Així, es pot dir que la grandària de la deleció està directament relacionat amb el tipus d'AME. Tot i això, no s'ha trobat cap individu que tingui delecionat tan sols el gen *NAIP*, per tant, no és el causant últim de la malaltia. El seu efecte en el fenotip no està clar. S'ha reportat però, que els pacients que no tenen delecionat el gen *NAIP* presenten una manifestació de la malaltia més tardana (Taylor J *et al.*, 1998).

***SERF-1 (Small EDRK-Rich Factor):*** Al 1998, Scharf JM *et al.* van trobar que el 90% dels pacients AME tipus I tenien delecionat un marcador microsatèl·lit de multicòpia (C212) que es trobava a un intró del gen *H4F5*. El fet que aquest gen estigués delecionat als pacients, el va fer un possible candidat com a modificador de l'AME. El marcador microsatèl·lit C212 es troba freqüentment delecionat als pacients amb AME tipus I en comparació amb els individus control. En canvi, a les formes tipus II la freqüència és menor, i a les tipus III lleugerament inferior als control. Posteriorment, s'ha anomenat a aquest gen *SERF-1* i és el gen que està més a prop de *SMN1* (Figura 3).

Pel que fa a la proteïna, encara no s'ha determinat la seva funció. Se sap però, que hi ha dues isoformes, la H4F5L i la 4F5S. Els transcrits de la forma L s'expressen a cor, cervell i múscul esquelètic. Les dues isoformes però, s'expressen a tot al sistema nerviós central, incloent la medul·la espinal (Scharf JM *et al.*, 1998).

***p44:*** Aquest és un altre dels gens que es troba a la regió crítica d'AME. Codifica per la subunitat de 44 kDa del factor de transcripció basal TFIIH. La còpia telomèrica del gen es troba parcialment delecionada entre un 15 i un 73% els pacients tipus I i entre un 7 i un 15% dels tipus II o III. Extractes cel·lulars de pacients amb deleció de la còpia telomèrica no presenten canvis en la transcripció ni en l'activitat reparadora del DNA. Això implica que la deleció homozigota del gen no té cap efecte perjudicial *in vitro*. Per tant, *p44* no es considera un candidat com a gen modificador de l'AME (Bürglen L *et al.*, 1997; Carter TA *et al.*, 1997).

## 6. DEL GEN A LA PROTEÏNA: EXPRESSIÓ I FUNCIO DE LA PROTEÏNA SMN

### Com s'expressen els gens *SMN1* i *SMN2*?

Els gens *SMN1* i *SMN2* s'expressen de manera ubiquitària però, tenen els dos promotors la mateixa activitat? En el cas que no la tinguessin, s'explicaria el fet que la presència de *SMN2* no sigui suficient per a contrarestar la deficiència de *SMN1* als pacients.

#### **a) Els promotors de *SMN1* i *SMN2***

Tant les activitats com les seqüències d'ambdós promotors són pràcticament idèntiques. Tan sols s'ha observat un nombre variable de repeticions (CA) que corresponen al marcador polimòrfic C272, no afectant a l'activitat del promotor (Echaniz-Laguna A *et al.*, 1999; Monani UR *et al.*, 1999b).

L'inici de la transcripció es situa a una caixa TATA a la posició -49. Aquí també s'hi troben els llocs consens d'unió d'AP-1 i CRE (*cAMP-Responsive Element*). Això ens indica que factors de transcripció com c-Fos, c-Jun i CREB (*Cre-Binding Protein*) podrien regular l'expressió dels gens *SMN*. S'han determinat també d'altres llocs consens d'unió a factors de transcripció associats a la diferenciació i a la supervivència de les cèl·lules neuronals, com AP-2 (Mitchell PJ *et al.*, 1991), N-Oct-3 (Schreiber E *et al.*, 1993), GATA-2 (Meng A *et al.*, 1997), HNF-3 (Jacob A *et al.*, 1997), YY1 (Zambrano N *et al.*, 1997) i E2F-1 (Dupont E *et al.*, 1998). A més a més, a la posició -65 respecte del lloc d'iniciació de la transcripció, s'ha identificat un element de regulació dels interferons (IRE; *Interferon Regulatory Element*) (Echaniz-Laguna A *et al.*, 1999). S'ha mostrat també que, els interferons poden induir l'expressió dels gens *SMN1* i *SMN2* *in vitro* (Baron-Delage S *et al.*, 2000).

#### **b) Els transcrits dels gens *SMN1* i *SMN2***

Estudis portats a terme per Lefebvre S *et al.* mitjançant Northern-blot amb RNA total de diferents teixits humans, mostren una expressió ubiquitària d'un transcrit de 1,7 kb (Lefebvre S *et al.*, 1995). Per altra banda, estudis fets per hibridació *in situ* en teixit fetal, també mostren que l'expressió és ubiquitària però més abundant a la medul·la espinal i al múscul esquelètic (Novelli G *et al.*, 1997). Pel que fa al sistema nerviós, tant les neurones motores com les cèl·lules piramidals del neocòrtex i les cèl·lules de Purkinje del cerebel presenten transcrits de *SMN*. En canvi, les neurones sensorials de la banya posterior de la

medul·la espinal i les arrels ganglionars dorsals tenen una expressió molt lleu. A més a més, el fet que ja a les 8 setmanes de desenvolupament fetal hi hagi expressió de SMN, fa pensar que el gen *SMN* juga un paper durant el desenvolupament (Tizzano EF *et al.*, 1998).

### **c) *Splicing* alternatiu de *SMN1* i *SMN2***

Fins ara s'han identificat 4 transcrits resultants d'un *splicing* alternatiu dels exons 3 (*SMNΔ3*), 5 (*SMNΔ5*), 7 (*SMNΔ7*) i 5-7 (*SMNΔ5,7*). Els estudis realitzats a múscul esquelètic i a línies cel·lulars limfoblàstiques demostren que el gen *SMN1* produeix majoritàriament el transcrit sencer (*full-length*) i un 10% de transcrits amb deleció de l'exó 5 (*SMNΔ5*). En canvi, el *SMN2* produirà transcrits amb deleció de l'exó 7 (*SMNΔ7*) en un 90% i tan sols un 10% de transcrits *full-length* (Lefebvre S *et al.*, 1995; Gennarelli M *et al.*, 1995; revisat per Wirth B, 2000) (Figura 5).

### **A on s'expressa la proteïna SMN?**

Gràcies a la generació d'anticossos específics per a la proteïna SMN, s'ha pogut determinar la seva expressió a diferents teixits i estadis del desenvolupament. S'ha vist que SMN s'expressa de forma ubiqüitària tan a teixit no nerviós (cor, fetge, múscul, pulmó, timus, pancrees, ronyó i cèl·lules limfoblàstiques), com del sistema nerviós central. A aquest nivell, els estudis a mamífers han demostrat la presència de la proteïna tant al soma cel·lular, com a les dendrites proximals de les grans neurones, així com a les cèl·lules piramidals del còrtex cerebral, cèl·lules de Purkinje del cerebel i neurones motores de la medul·la espinal lumbar. A més a més, la proteïna SMN es detecta dins de les nombroses cèl·lules de la substància gris del sistema nerviós central (Battaglia G *et al.*, 1997; Francis JW *et al.*, 1998). Estudis fets amb rates han permès mostrar que la proteïna també s'expressa al compartiment axonal, sobretot durant el desenvolupament, suggerint que és activament transportada dins dels diferents compartiments cel·lulars durant l'ontogènesi neuronal (Pagliardini S *et al.*, 2000).

Pel que fa al múscul fetal humà, la proteïna SMN s'expressa al citoplasma concentrada a unes grans estructures citoplasmàtiques de mida similar a les gems (0,1-1,0 μm), que no corresponen a cap estructura coneguda (Burlet P *et al.*, 1998).

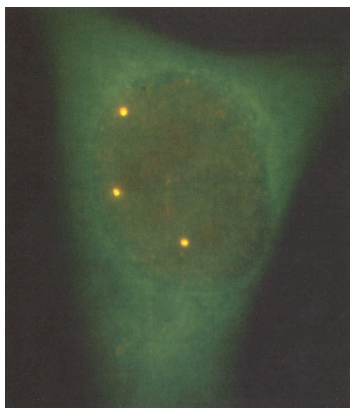
Diferents estudis han mostrat una disminució de la quantitat de la proteïna SMN en el període postnatal, tant a l'home (Lefebvre S *et al.*, 1997; Coover D *et al.*, 1997; Burlet P *et al.*, 1998) com a rates o ratolins (La Bella V *et al.*, 1998; Williams BY *et al.*, 1999;

Pagliardini S *et al.*, 2000; Jablonka S *et al.*, 2001), suggerint-se doncs, un paper important de SMN durant el desenvolupament.

En analitzar diferents teixits de fetus amb AME, es va trobar un descens de la proteïna a la medul·la espinal en comparar-los amb els controls (Lefebvre S *et al.*, 1997; Coover D *et al.*, 1997). El mateix van trobar a múscul fetal (Burlet P *et al.*, 1998). Lefebvre S *et al.* van demostrar així una correlació negativa entre la severitat clínica de l'AME i els nivells de proteïna SMN a cèl·lules limfoblàstiques de pacients. Aquest estudi suggereix que a les formes intermèdies, la proteïna SMN que deriva del gen *SMN2* pot compensar parcialment l'absència de *SMN1*. Aquests resultats sostenen la hipòtesi d'un efecte de dosi de SMN dins de l'AME, depenent els nivell de proteïna del nombre de còpies del gen *SMN2* (Lefebvre S *et al.*, 1997).

## Caracterització de la proteïna SMN

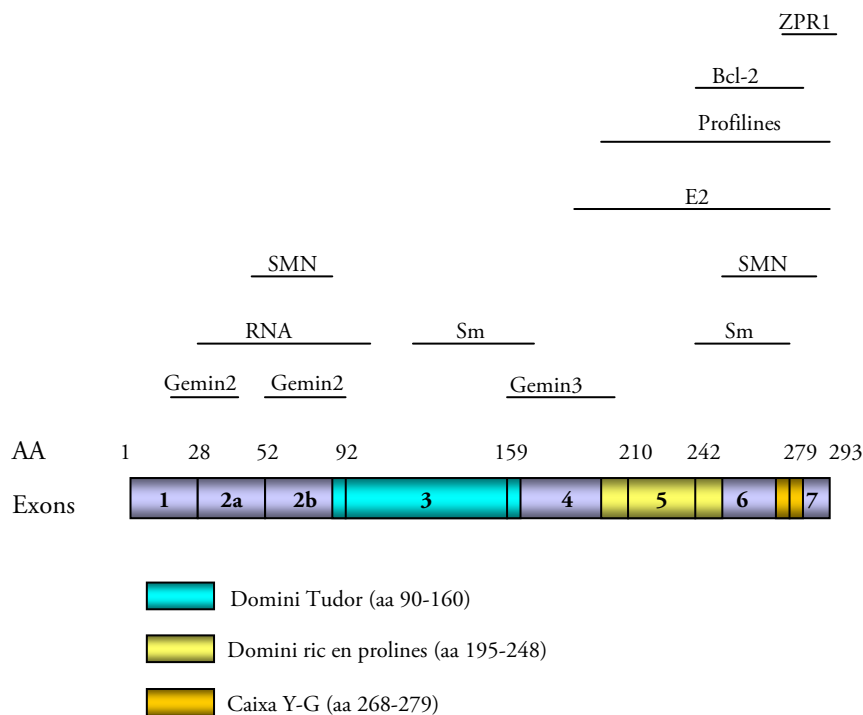
La proteïna SMN consta de 294 aminoàcids i té un pes molecular de 38 kDa, no trobant-se homologia amb cap de les proteïnes existents. La proteïna SMN es localitza a unes estructures nuclears que s'anomenen gems per la seva semblança amb els cossos de Cajal (*gemini* o bessons dels cossos de Cajal), amb els quals sovint estan associades. També la podem trobar al citoplasma, però aquí té una distribució més difusa (Figura 8) (Lui Q i Dreyfuss G, 1996). Els individus normals tenen entre 2 i 8 gems (revisat per Matera AG i Frey MR, 1998). En canvi, en pacients amb AME el nombre es veu reduït de forma significativa en els tipus I i això es correlaciona amb la severitat clínica (Coover D *et al.*, 1997; Lefebvre S *et al.*, 1997).



**Figura 8.** Colocalització de les gems i dels cossos de Cajal al nucli de cèl·lules HeLa. Marcatge amb anti-SMN (verd) i anti-p80 (marcador específic de cossos de Cajal; vermell). El solapament d'ambdues estructures donarà un color groc. La proteïna SMN també es localitza al citoplasma (Matera AG i Frey MR, 1998).

La proteïna SMN forma part d'un gran complex multiproteic, en el que interacciona amb Gemin2 (SIP1: *SMN Interacting Protein 1*), Gemin3 (dp103; *putative DEAD-box helicase*), Gemin4 (GIP1: *Gemin3 Interacting Protein*), Gemin5, Gemin6, Gemin7 i amb ella

mateixa (Baccon J *et al.*, 2002). A més a més, s'han identificat altres proteïnes que interaccionen directament o a través de les Gemin amb la proteïna SMN (Figures 9 i 10A; Taula 2). La majoria d'aquestes proteïnes contenen el domini RG (ric en arginina i glicina), que és necessari per a la seva interacció amb SMN. Tot i que encara no se sap quines implicacions funcionals poden tenir aquestes interaccions, la majoria apunten a que SMN està involucrada en l'acoblament de les snRNPs (*small nuclear Ribonucleoprotein*) en la maquinària d'*splicing*, que participa en el procés d'*splicing* mateix i intervé en la transcripció (Paushkin S *et al.*, 2002).



**Figura 9.** Representació esquemàtica dels llocs d'unió de diverses proteïnes que interaccionen amb SMN.



**Taula 2.** Taula resum de les proteïnes que interaccionen amb SMN o algun dels components del complex.

Proteïna	Funció	Autors
SMN	-	Liu Q i Dreyfuss G, 1996; Lorson CL <i>et al.</i> , 1998a; Young PJ <i>et al.</i> , 2000
SIP1 (Gemin2)	Biogènesi de les snRNPs?	Liu Q i Dreyfuss G, 1996
hnRNP U	Tractament i transport mRNA	Liu Q i Dreyfuss G, 1996
Fibrilarina	Tractament del mRNA	Liu Q i Dreyfuss G, 1996
coilina	Biogènesi de les snRNPs	Pellizzoni L <i>et al.</i> , 1998
Bcl2	Antiapoptòtica	Iwahashi H <i>et al.</i> , 1997; Sato K <i>et al.</i> , 2000
Sm i Lsm	Components de les snRNPs	Liu Q <i>et al.</i> , 1997; Friensen WJ <i>et al.</i> , 2001
Gemin3 (dp103)	RNA helicasa?	Charroux B <i>et al.</i> , 1999; Campbell L <i>et al.</i> , 2000
E2	Activador de la transcripció	Strasswimmer J <i>et al.</i> , 1999
Profilines	Regulació de la unió de Sm a SMN.	Giesemann T <i>et al.</i> , 1999
EBNA2, EBNA3C	Activació de la transcripció	Grundhoff AT <i>et al.</i> , 1999; Barth S <i>et al.</i> , 2003
Gemin4 (GIP1)	Metabolisme del mRNA ribosomal?	Charroux B <i>et al.</i> , 2000
FBP	Regulador de la transcripció i de l'estabilitat del mRNA	Williams BY <i>et al.</i> , 2000
RHA	RNA helicasa	Pellizzoni L <i>et al.</i> , 2001
ZPR1	Funció desconeguda	Gangwani L <i>et al.</i> , 2001
GAR1	Acoblament i metabolisme de snoRNPs	Pellizzoni L <i>et al.</i> , 2001, Whitehead SE <i>et al.</i> , 2002
Gemin5	Funció desconeguda	Gubitz AK <i>et al.</i> , 2002
Gemin6	Funció desconeguda	Pellizzoni L <i>et al.</i> , 2002a
Gemin7	Funció desconeguda	Baccon J <i>et al.</i> , 2002
Nucleolina/B23	Metabolisme RNA ribosomal	Lefebvre S <i>et al.</i> , 2002
hnRNP-R	Tractament, transport i <i>splicing</i> del mRNA	Rossoll W <i>et al.</i> , 2002
gry-rbp/hnRNP-Q	Tractament, transport i <i>splicing</i> del mRNA	Rossoll W <i>et al.</i> , 2002
R2-PPP4c	Localització de les snRNPs	Carnegie GK <i>et al.</i> , 2003
FGF-2	Modulador del creixement cel·lular	Claus P <i>et al.</i> , 2003

S'ha observat que les mutacions a SMN (SMNY272C, SMN $\Delta$ 7) comporten una reducció en la unió amb SMN salvatge, amb les proteïnes Sm, snRNPs i hnRNPs. En canvi, les mutacions no afecten la unió de Gemin2 amb SMN mutades (Pellizzoni L *et al.*, 1999; Bühler D *et al.*, 1999; Rossoll W *et al.*, 2002).

## Funció de la proteïna SMN

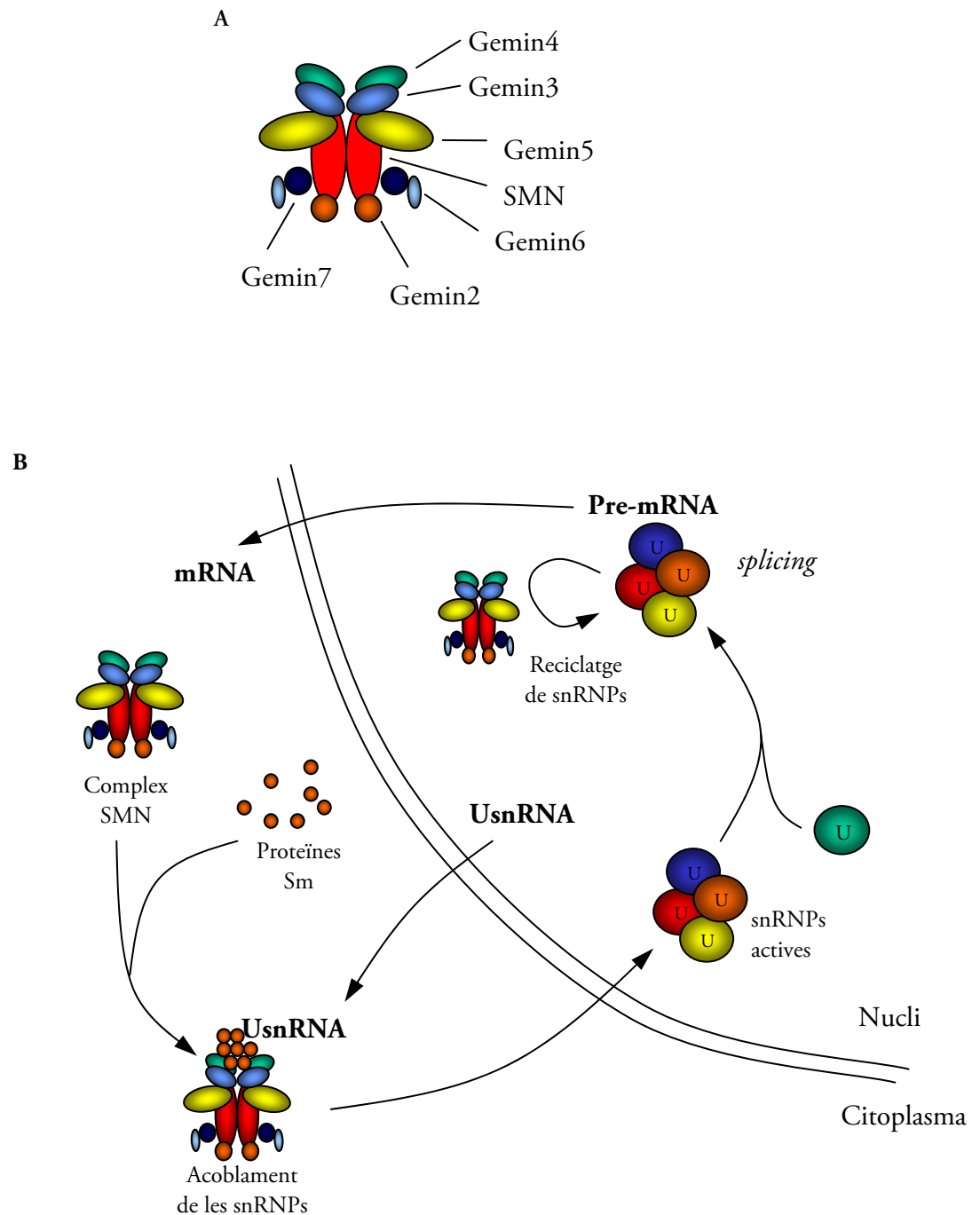
**SMN en l'acoblament de les snRNPs:** La proteïna SMN, juntament amb Gemin2, juguen un paper essencial en l'acoblament de les snRNPs al citoplasma abans de que entrin al nucli, a on intervindran en l'*splicing* del pre-mRNA (Fischer U *et al.*, 1997). Aquesta funció es dona gràcies a la seva unió a les proteïnes Sm. SMN i Gemin2 s'associen específicament amb els snRNAs U1 i U5 abans de que es doni l'acoblament de les snRNPs i la seva importació al nucli (Figura 10B). En inhibir tant SMN com Gemin2 amb anticossos, s'observa una disrupció en la biogènesi de les snRNPs, el que fa pensar que estan directament implicades en aquest mecanisme (Fischer U *et al.*, 1997; Bühler D *et al.*, 1999; Pellizzoni L *et al.*, 2002b). Recentment, s'ha demostrat que el complex PRMT5, implicat en la metilació i emmagatzematge de les proteïnes Sm, interacciona amb el complex SMN i en potencia la seva activitat (Meister G i Fisher U, 2002) .

**SMN en l'*splicing* del pre-mRNA:** S'ha hipotetitzat que la proteïna SMN intervé en el metabolisme del RNA al nucli i en el reciclatge de les snRNPs. SMN interacciona amb diversos components del complex d'*splicing* nuclear. A més a més, estudis amb proteïna SMN mutada (SMN $\Delta$ N27) i amb anticossos dirigits contra la regió N-terminal, han mostrat un bloqueig en la formació del complex d'*splicing* madur o complex C (Figura 10B) (Pellizzoni L *et al.*, 1998; Meister G *et al.*, 2000).

**SMN en la transcripció:** SMN interacciona també directament o indirectament amb factors de transcripció, com és el cas de l'activador transcripcional nuclear E2 del papilomavirus, de manera que exerceix un augment en la seva transcripció depenent de E2. Per altra banda, la proteïna Gemin3 s'uneix a factors transcripcionals virals i cel·lulars. Tot i això, no es coneix exactament quin paper juga SMN en la regulació de la transcripció, encara que podria intervenir en l'acoblament dels components necessaris perquè es dugui a terme (Strasswimmer J *et al.*, 1999; Grundhoff AT *et al.*, 1999; Pellizzoni L *et al.*, 2001).

Fins ara, no s'han trobat evidències de que l'*splicing* del mRNA estigui bloquejat a les neurones motores dels pacients amb AME. En experiments fets amb models de ratolí de la

malaltia, l'*splicing* del mRNA no es veu alterat (Jablonka S *et al.*, 2000). En canvi, han trobat que una deficiència en la producció de snRNPs U contribueix a la degeneració de les neurones motores (Jablonka S *et al.*, 2002).



**Figura 10. A.** Model de la interacció dels components del complex SMN (modificat de Baccon J *et al.*, 2002). **B.** Esquema del rol de SMN en la biogènesi de les snRNPs i l'*splicing* del mRNA (modificat de MacKenzie AE i Gendron NH, 2001 i Paushkin S *et al.*, 2002).

Totes aquestes funcions són essencials per a tots els tipus cel·lulars. En canvi, són les neurones motores les cèl·lules principalment afectades a l'AME. Això fa pensar que SMN podria tenir altres funcions específiques i vitals per a aquestes cèl·lules.

**Altres funcions de la proteïna SMN:** S'han atribuït diverses funcions a SMN en base a la seva unió amb altres proteïnes. Es pensa que pot intervenir en el metabolisme del RNA ribosòmic degut a la seva interacció amb la fibrilarina i amb els cossos de Cajal, ambdós localitzats al nuclèol (Charroux B *et al.*, 2000). Per altra banda, les profilines podrien jugar un paper en la regulació de la fixació de Sm a SMN, degut a que tenen el domini d'unió a SMN proper al de les proteïnes Sm (Giesemann T *et al.*, 1999). A més a més, la FBP (*FUSE-Binding Protein*) té una regulació similar a la de SMN, i podria ser que la interacció d'ambdues fos crítica pel desenvolupament de les neurones motores, obtenint-se així l'especificitat en l'acció de AME (Williams BY *et al.*, 2000). Recentment, s'ha reportat que la proteïna SMN pot jugar un paper en la biogènesi de les telomerasas, ja que existeix una associació entre SMN i la RNP telomerasa (Bachand F *et al.*, 2002).

Una altra funció que se li atribueix a SMN, és la d'intervenir en l'organització del citoesquelet de les neurones. Utilitzant un model animal de la malaltia, s'ha detectat una organització aberrant del citoesquelet a les terminacions sinàptiques, el que s'associa a una alteració en les estructures postsinàptiques i el creixement axonal (Cifuentes-Diaz C *et al.*, 2002). Aquesta hipòtesi es veu reforçada per Fan L i Simard LR, els quals han demostrat que SMN intervé en el creixement de les neurites. Detecten acumulacions de la proteïna en el conus de creixement de neurones i cèl·lules de la glia, així com expressió a les unions neuromusculars (Fan L i Simard LR, 2002). A més a més, s'ha vist que els nivells de SMN depenen de l'activitat sinàptica (Andreassi C *et al.*, 2002). Finalment, SMN interactua amb una hnRNP, que és predominant als axons de les neurones, el que connectaria la funció de SMN en el metabolisme del RNA amb l'especificitat neuronal en l'AME (Rossoll W *et al.*, 2002).

## 7. MODELS ANIMALS

L'AME és una malaltia que actualment no té cap tractament eficaç. Per tal de poder fer els assajos clínics per trobar una bona teràpia, és necessari comptar amb un model animal que s'assembli al màxim als pacients, pel que fa a les característiques patològiques. Per altra banda, ens permetran esbrinar el funcionament de la proteïna SMN, i com la seva manca o disrupció causen la malaltia, ja que les neurones motores dels pacients tan sols poden ser

investigades després de fer-se l'autòpsia, és a dir, quan la malaltia ja ha finalitzat el seu procés, o bé durant el període fetal.

Un dels animals en que es va pensar en primer moment per a desenvolupar un model, va ser el ratolí. La identificació del gen *SMN* homòleg (*Smn*) (DiDonato CJ *et al.*, 1997b; Violet L *et al.*, 1997) va permetre que es pogués eliminar aquest gen, és a dir, que es fes un ratolí *knockout* (Schrank B *et al.*, 1997). Els embrions *Smn knockout* (*Smn*<sup>-/-</sup>) pateixen una apoptosi massiva a l'estadi primerenc de blastòcit i moren abans de la implantació. Aquest fet va donar l'evidència definitiva de que *SMN* és un gen essencial. Els ratolins tan sols en tenen una còpia, que serà eliminat en els *knockout*. Per tant, hi haurà una manca completa de la proteïna SMN portant a la mort embrionària. En canvi, els pacients amb AME tindran el gen *SMN2*, que els permetrà produir prou proteïna com perquè es pugui dur a terme el desenvolupament embrionari.

Podem trobar dos tipus de models animals d'AME: Els models no homòlegs a l'AME i els models genètics, desenvolupats recentment.

## Models no homòlegs a l'AME

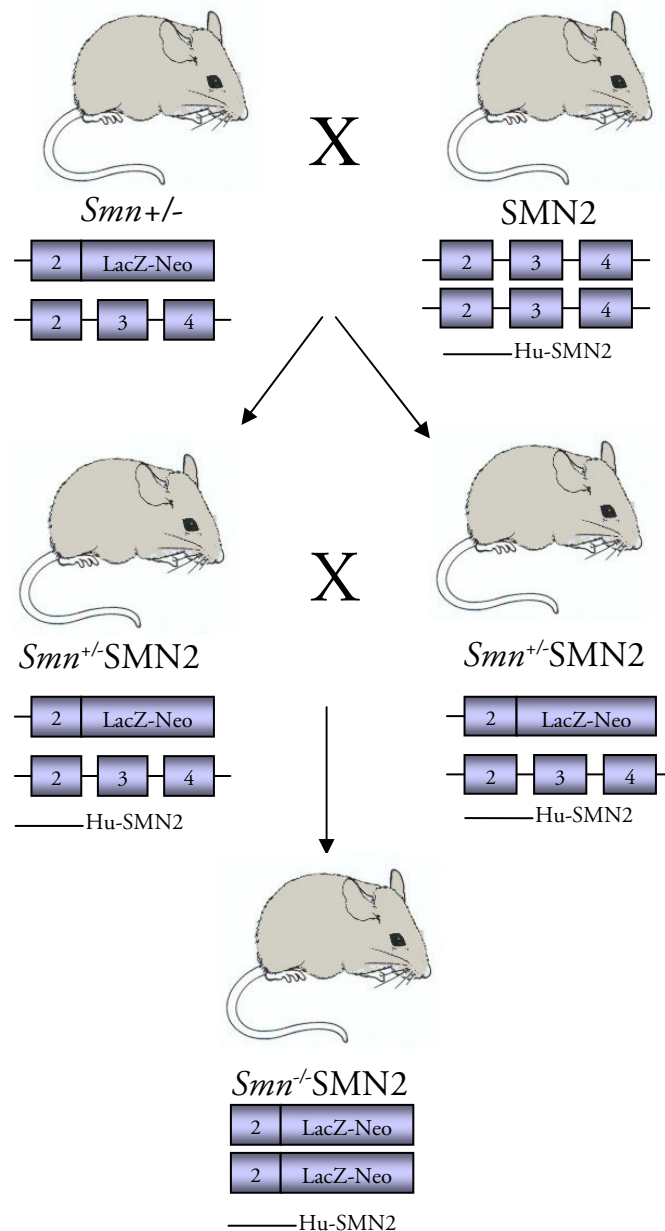
Mutacions en nombrosos gens donen lloc a fisiopatologies similars a les observades en l'AME. Aquests fenotips patològics descrits a diverses espècies, es van caracteritzar en un inici com a models animals per a aquesta malaltia. Uns exemples són els ratolins *wobbler*, el *mdf* (*muscle deficient mouse*) i el *pmn* (*progressive motor neuropathy*) (Schmalbruch H *et al.*, 1991; Kaupmann K *et al.*, 1992; Blot S *et al.*, 1995), el gos HCSMA (*Hereditary Canine Spinal Muscular Atrophy*) (Cork LC *et al.*, 1979) i les vaques Holstein-Friesian (Pumarola M *et al.*, 1997). Hi ha però, molts altres models descrits (revisat per Sillevs Smitt PA i de Jong JM, 1989). Encara que aquests models presenten patologies similars a l'AME, cap d'ells són el resultat d'una mutació al gen *SMN*. És per això que és important desenvolupar models que sí involucrin una mutació en aquest gen.

## Models genètics de l'AME

Tant els ratolins com les rates tenen una sola còpia del gen *Smn* i, fins ara, no s'ha trobat cap mutació espontània en aquest gen a ratolins amb degeneració de les neurones motores. El que s'ha volgut doncs, és reduir la quantitat de la proteïna SMN a uns nivells no tan dràstics o a un teixit específic.

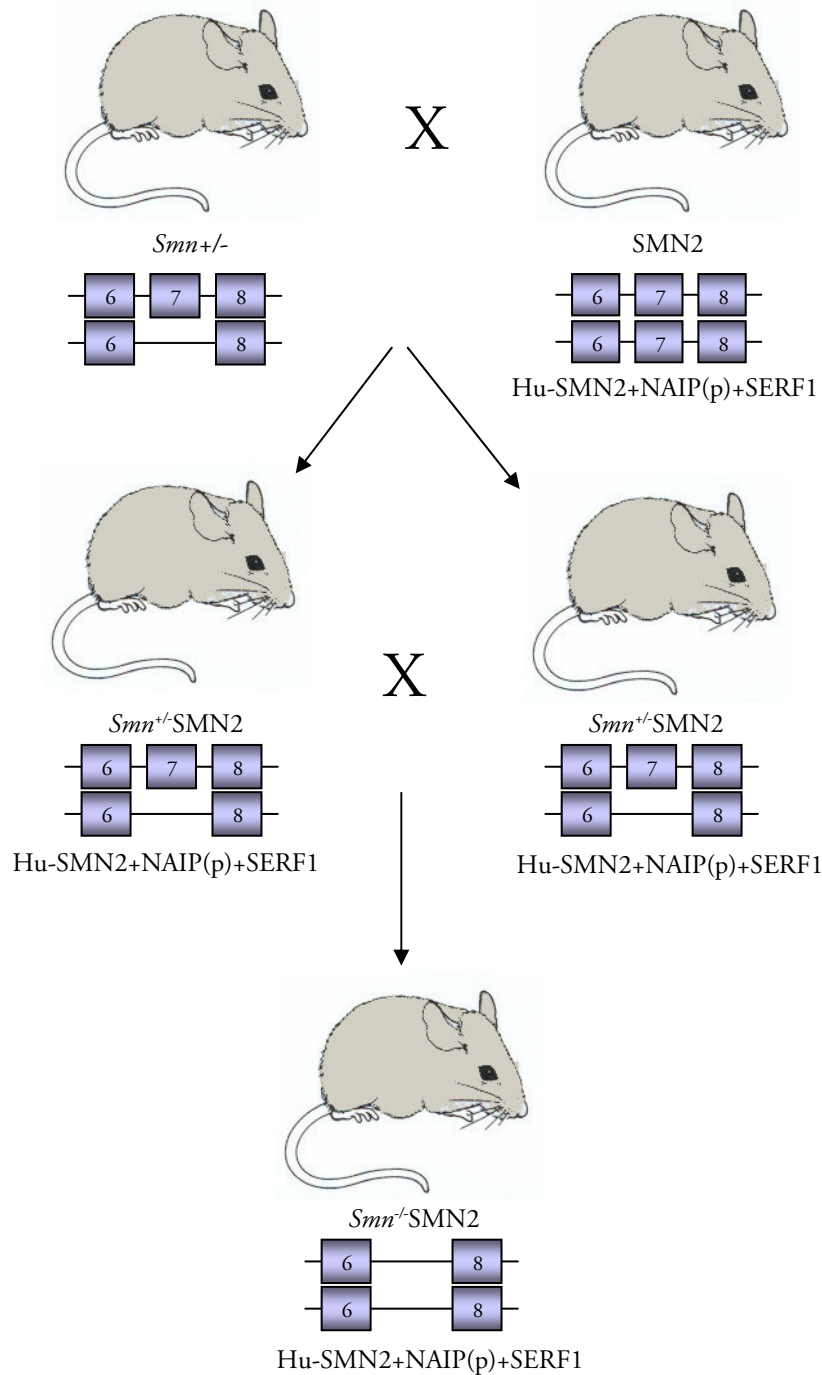
**Ratolí heterozigot *Smn*<sup>+/-</sup>:** Aquest ratolí és la versió heterozigota del *knockout*, de manera que tan sols té una còpia de *Smn*. Mostra una disminució d'un 50% en els nivells de la proteïna a la medul·la espinal, presentant una AME lleu (tipus III). Pel que fa a la distribució de la proteïna, van trobar que la taxa d'aquesta disminueix considerablement al citoplasma, mentre que el nombre de gems, és a dir, la proteïna nuclear, no presenta variacions comparat amb els controls. En néixer, el nombre de neurones motores medul·lars és normal, però la meitat d'elles es perden durant els 6 primers mesos de vida, sense més pèrdua entre els 6 i els 12 mesos (Jablonka S *et al.*, 2000). Tot i la manca d'un nombre tan gran de neurones motores, no s'observa cap signe de denervació muscular ni dèficit motor. En canvi, en la malaltia humana, un dels signes constant és el dèficit muscular com a procés secundari a la denervació muscular.

**Model “americà”:** Monani UR *et al.* van adoptat l'estratègia de generar un model de ratolí en el que es rescata el *knockout* desenvolupat per Schrank B *et al.* anteriorment, permetent la seva supervivència (Schrank B *et al.*, 1997). S'obté creuant un ratolí heterozigot *Smn*<sup>+/-</sup> produït per recombinació homòloga, amb un altre que expressi el gen *SMN2* humà. Aquest gen s'introdueix mitjançant la microinjecció d'un transgèn de *SMN2* (Monani UR *et al.*, 2000a) (Figura 11). Els ratolins que mostren un nombre escàs de còpies del transgèn *SMN2*, i un al·lel nul per *Smn* (*Smn*<sup>-/-</sup>) desenvolupen un fenotip sever, que els conduirà a la mort, ja sigui *in utero*, a les 6 primeres hores després del naixement o als 6 dies de vida. Els ratolins *Smn*<sup>-/-</sup> amb un nombre elevat de còpies del transgèn mostraran un fenotip normal. Finalment, els ratolins mutants supervivents portadors d'un nombre baix de còpies del transgèn *SMN2* desenvoluparan un comportament motor anormal. Això està associat a una pèrdua severa del nombre de neurones motores de la medul·la espinal i del cerebel, dins de l'últim estadi de la malaltia, tot i que aquest nombre varia en el moment de néixer. Aquestes observacions suggereixen que la mort neuronal es presenta de manera tardana en la malaltia. A més a més, l'absència d'un fenotip anormal en els individus amb un nombre elevat de còpies del transgèn *SMN2*, confirma que el gen *SMN2* és capaç d'impedir la letalitat embrionària dels ratolins *Smn*<sup>-/-</sup> i demostra que un nombre elevat de còpies del gen disminueix la severitat del fenotip.



**Figura 11.** Estratègia del grup americà-alemany en la producció d'un model d'AME murí utilitzant el gen *SMN2* humà. En aquest cas, creuen un ratolí amb delecció heterozigota del gen *Smn* a partir de l'exó 2, amb una línia transgènica per *SMN2* humà. S'obtenen doncs, ratolins heterozigots per la mutació a *Smn* i amb el transgèn. Al intercreuar-lo s'obtindran ratolins amb la delecció homozigota del gen *Smn* i el transgèn humà, desenvolupant així un fenotip anormal però no letal.

**Model "tailandès":** Hsieh-Li *et al.* van desenvolupar un model molt similar a l'americà poc abans que aquests, creant un ratolí *Smn knockout* viable també introduint-li transgèns de *SMN2*. En aquest cas però, es microinjecta un transgèn de DNA genòmic amb una part de *NAIP* i *SERF1* (Hsieh-Li HM *et al.*, 2000) (Figura 12).



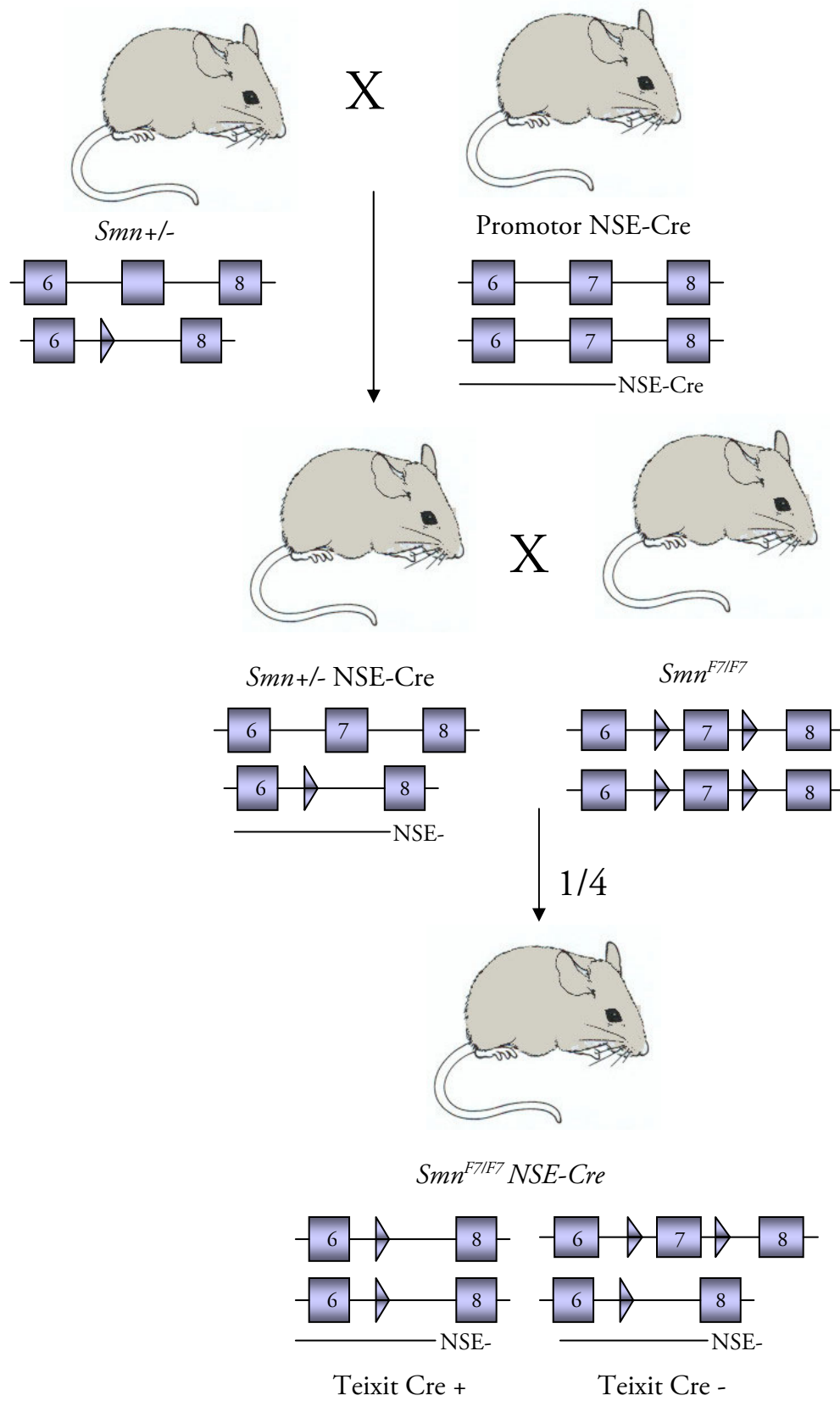
**Figura 12.** Estratègia del grup tailandès en la producció d'un model d'AME murí utilitzant el gen *SMN2* humà. Primer creuen un ratolí amb deleció homozigota de l'exó 7 del gen *Smn* amb un ratolí transgènic per *SMN2* humà, una part de *NAIP* (*NAIP(p)*) i *SERF1*. Després intercreuen els heterozigots transgènics i obtenen ratolins amb deleció homozigota de l'exó 7 de *Smn* i el transgèn humà, de manera que s'obté un fenotip anormal però s'evita la letalitat que comporta la deleció homozigota a ratolins.



Els ratolins, que són homozigots per la deleció de l'exó 7 del gen *Smn* i que tenen el transgèn *SMN2*, desenvolupen tota una sèrie de simptomatologia i una notable pèrdua de pes. Presenten una cua més curta i gruixuda amb edemes subcutanis i necrosi crònica, essent també present les dues últimes a les potes del darrera. Pel que fa a la medul·la espinal, mostren una disminució en el nombre de neurones motores en la banya anterior, deixant el que s'anomenen *empty cell beds*, que són els espais buits a on es trobaven les cèl·lules. Algunes neurones motores presenten una cromatòlisi central, les cèl·lules de la glia s'extenen, els axons de les arrels anteriors degeneren i hi ha una pèrdua selectiva de les fibres mielinitzades gruixudes.

El temps de supervivència és variable. Al fenotip més sever o tipus I els ratolins moren abans dels 10 dies. En canvi, els que presenten un fenotip intermedi o tipus II mostren una baixa activitat i moren abans de les 4 setmanes. Finalment, els de tipus III no presenten cap alteració en l'esperança de vida, tot i que tenen una cua més curta i gruixuda. En aquest model, seria necessària una caracterització més fina del sistema neuromuscular a fi i efecte de determinar si realment és un model vàlid per l'AME.

**Model “francès”:** El tercer mètode, desenvolupat per Frugier T *et al.* és el que s'anomena **mutant neuronal** (Frugier T *et al.*, 2000). Consisteix en produir una deleció condicional de l'exó 7 del *Smn* a neurones, utilitzant el sistema de recombinació Cre/loxP (Figura 13). Quan el gen de la Cre recombinasa s'expressa ubiqüitàriament, els ratolins amb la deleció homozigota moren durant els primers estadis del desenvolupament fetal. És per això que van decidir expressar el gen de la Cre recombinasa sota el control del promotor de l'enolasa específica de neurona (NSE: *Neuron Specific Enolase*), de manera que s'indueix la deleció de *Smn* a neurones. Aquests ratolins són normals en néixer, però dues setmanes després desenvolupen dèficits motors i tremolor. Moren entre 17 i 36 dies després del naixement. No hi ha pèrdua de neurones motores, tot i que el múscul esquelètic mostra clars signes histològics de denervació. El soma de les neurones motores és aparentment normal, encara que la membrana nuclear presenta fenedures. Aquest estudi suggereix que la deleció en *Smn* a les neurones és la causa primera del fenotip SMA.



**Figura 13.** Estratègia del grup francès per produir el model murí d'AME utilitzant el sistema de *Cre-loxP*. Primer creuen ratolins heterozigots per la deleció de l'exó 7 de *Smn* amb transgènics per la Cre recombinasa unida a un promotor específic de teixit (neuronal o muscular). D'aquí s'obtenen ratolins heterozigots per la mutació i transgènics. Aquests es creuaran amb ratolins als que se'ls ha introduït llocs *loxP* a banda i banda de l'exó 7 per recombinació homòloga. S'obtenen així ratolins homozigots per la deleció en aquells teixits en que s'ha expressat la Cre recombinasa. En canvi, en els teixits en que el promotor no actua, la Cre recombinasa no s'expressarà i no s'eliminarà d'exó 7, obtenint-se mutants heterozigots.

El grup francès també ha creat l'anomenat **mutant muscular** (Cifuentes-Diaz C *et al.*, 2001). En aquest cas, s'ha delecionat l'exó 7 de *Smn* utilitzant el mateix sistema de recombinació Cre/loxP però induït específicament al múscul esquelètic. Aquí però, la recombinasa s'expressarà sota el control del promotor de l' $\alpha$ -actina esquelètica (HSA: *Human  $\alpha$ -Skeletal Actin*). Aquests ratolins tenen una mitjana de vida de 33 dies i, després de 3 setmanes del naixement, comencen a patir una paràlisi muscular progressiva. L'anàlisi morfològic del múscul mostra una variació en la mida de les fibres, infiltracions de teixit connectiu amb cèl·lules mononuclears, necrosi i miòcits regenerants amb nucli central. La distrofina mostrarà també un patró d'expressió anormal, obtenint-se doncs un fenotip distròfic. De tota manera, aquest model no presenta denervació ni modificacions morfològiques de les neurones motores. Així doncs, els canvis musculars, resultants d'una mutació en el gen *Smn* dins del teixit muscular esquelètic, no conduiran a una degeneració de les neurones motores (Taula 3).

**Taula 3.** Diferències entre el mutant neuronal i el muscular.

Mutant neuronal	Mutant muscular
Dèficit motor progressiu	Dèficit motor progressiu
Denervació muscular	Distròfia muscular
Anomalies morfològiques a neurones motores	Absència de dany neuronal
	Desestabilització del sarcolema

# Introducció

Models genètics de l'AME				
Característiques	Ratolí AME Tipus I	Ratolí AME Tipus II-III	Ratolí AME Tipus III (Mutant Muscular)	Ratolí AME Tipus III-IV
<b>Genotip</b>	SMN2; <i>Smm</i> <sup>-/-</sup>	SMN2; <i>Smm</i> <sup>-/-</sup> i SMN <sup>Δ7/Δ7</sup>	SMN2;SMN <sup>Δ7/Δ7</sup>	<i>Smm</i> <sup>+/-</sup>
<b>Cromosoma</b>	13	13	13	13
<b>Edat d'inici</b>	~3 dies	SMN2; <i>Smm</i> <sup>-/-</sup> : 1 setmana SMN <sup>Δ7/Δ7</sup> ; 2 setmanes	3 setmanes	Debilitat no manifesta
<b>Característiques</b>	Debilitat muscular severa, 40% de neurones motores (NM) espinals i facials pèrdues en 6 dies; patologia muscular no remarcable	Atròfia neurogènica del múscul; paràlisi; cromatòlisi de les NM espinals; no pèrdua de NM en ratolins SMN <sup>Δ7/Δ7</sup>	Paràlisi muscular progressiva; fenotip muscular distròfic; no signes de denervació ni canvis morfològics en NM	~50% de les NM espinals moren en 6 mesos; patologia muscular normal
<b>Herència</b>	AR	AR	Vist en heterozigots	Vist en heterozigots
<b>Supervivència</b>	1 setmana	Tipus II: 4 setmanes Tipus III: 2 anys.	33 dies	2 anys
<b>Referències</b>	Hsieh-Li HM <i>et al.</i> , 2000 Monani UR <i>et al.</i> , 2000a	Hsieh-Li HM <i>et al.</i> , 2000 Frugier T <i>et al.</i> , 2000	Cifuentes-Diaz C <i>et al.</i> , 2001	Jablonka S <i>et al.</i> , 2000

**Taula 4.** Models genètics de l'AME. NM: Neuron motora. AR: Herència autosòmica recessiva (modificat de Monani UR *et al.*, 2000b).

## 8. POSSIBLES TERÀPIES

Els models animals d'AME ens són molt útil per esbrinar el funcionament de la malaltia, però també ens serviran per testar possibles estratègies terapèutiques. La primera idea que va sorgir va ser transferir el gen que manca, el *SMN1*, dins de la medul·la espinal. Per fer-ho, es va pensar en vectors virals com adenovirus (Akli S *et al.*, 1993; DiDonato CJ *et al.*, 2003), lentivirus (Hottinger AF *et al.*, 2000), virus associats a adenovirus (Azzouz M *et al.*, 2000), herpesvirus (Keir SD *et al.*, 1995) o poliovirus (Bledsoe AW *et al.*, 2000), ja que poden transduir neurones motores *in vivo* de manera molt eficient. Cada un d'aquest virus té limitacions pel que fa a la toxicitat, immunogenicitat, seguretat biològica, estabilitat en l'expressió del gen, nivells de producció, etc. Però el més important és que tots els vectors tenen un problema comú: quan són injectats en el parènquima del sistema nerviós central, la seva difusió es redueix a uns pocs mil·límetres. També, si s'injecta al múscul perifèric, la infecció retrògrada de les neurones motores es dona a un sol conjunt motor. Així doncs, sembla ser que, un prerequisit perquè es doni la transferència del gen *SMN* a través de virus és identificar aquelles poblacions de neurones motores que són més sensibles al procés degeneratiu, i que són crítiques per a la supervivència de l'individu.

En analitzar els pacients AME, es va poder observar que, la severitat de la malaltia estava estretament correlacionada amb els nivells d'expressió de *SMN2*. Aquests estaven evidenciats pel nombre de còpies del gen, els nivells de la proteïna SMN o el nombre de gems. Els models animals han pogut corroborar que *SMN2* pot compensar la manca de *SMN1* i atenuar la severitat clínica. Per tant, seria interessant poder activar l'expressió de *SMN2* a través de l'administració d'algun fàrmac. Diversos grups han testat un ampli espectre de molècules, esperant que alguna d'elles pugui activar el promotor de *SMN2*. Aquest promotor conté molts llocs d'unió a factors de transcripció implicats en la diferenciació o supervivència neuronals, tals com AP-2, E2F-1, GATA-2, HNF-3, N-Oct-3 o YY1 (Echaniz-Laguna A *et al.*, 1999; Monani UR *et al.*, 1999b). Els experiments s'han fet en neurones motores primàries, línies de cèl·lules neuronals o cèl·lules heteròlogues. Els paràmetres que s'han analitzat per tal de detectar els canvis són l'expressió de l'activitat del promotor de *SMN2* i el nombre de gems al nucli (Zhang ML *et al.*, 2001).

Per altra banda, Hofmann *et al.* han identificat un regulador del processament del mRNA de *SMN* gràcies als estudis fets *in vivo*, tant en cèl·lules humanes com murines. Aquest regulador és un factor d'*splicing* SR-like anomenat Htra2-β1 que promou la inclusió de l'exó 7 de *SMN*, estimulant l'expressió de *SMN2 full-length*. Demostren doncs que, el processat del mRNA de *SMN* es pot modular *in vivo*. El fet que tots els pacients amb AME tinguin al menys una còpia de *SMN2*, fa que aquesta estratègia sigui una possible via pel tractament de l'AME (Hofmann Y *et al.*, 2000; Hofmann Y i Wirth B, 2002). Seguint el

mateix objectiu, un altre grup ha dissenyat oligonucleòtids complementaris a l'exó 7 i que contenen motius ESE. L'administració d'aquests oligonucleòtids recupera la incorporació de l'exó 7 de *SMN2* a fibroblasts de pacients (Skordis LA *et al.*, 2003).

Més recentment, s'han testat varis components que han donat resultats esperançadors. Un d'ells és el butirat de sodi. El grup de Chang JG *et al.* han utilitzat limfòcits de pacients amb AME per testar el fàrmac, i han pogut veure un augment de la proteïna SMN *full-length* gràcies a l'alteració del patró d'*splicing* de l'exó 7 en el gen *SMN2*. En estudis *in vivo*, en els que utilitzen el model de ratolí dissenyat anteriorment per ells mateixos, han pogut observar un augment de l'expressió de la proteïna SMN a les neurones motores de la medul·la espinal, i una millora significativa en la simptomatologia clínica (Hsieh-Li HM *et al.*, 2000; Chang JG *et al.*, 2001).

Per altra banda, Andreassi C *et al.* han trobat que, l'aclarubicina augmenta la retenció de l'exó 7 en el transcrit *SMN2*, tant dels gens endògens de fibroblasts de pacients tipus I, com en minigèns de *SMN2* en la línia cel·lular de neurona motora NSC34. Als fibroblasts de pacients tipus I, després del tractament amb aclarubicina, s'observa un augment de la proteïna SMN i un increment en el nombre de gens (Andreassi C *et al.*, 2001). Així doncs, les alteracions en el patró d'*splicing* podrien ser una bona eina per modificar l'expressió dels gens alterats en certes malalties.

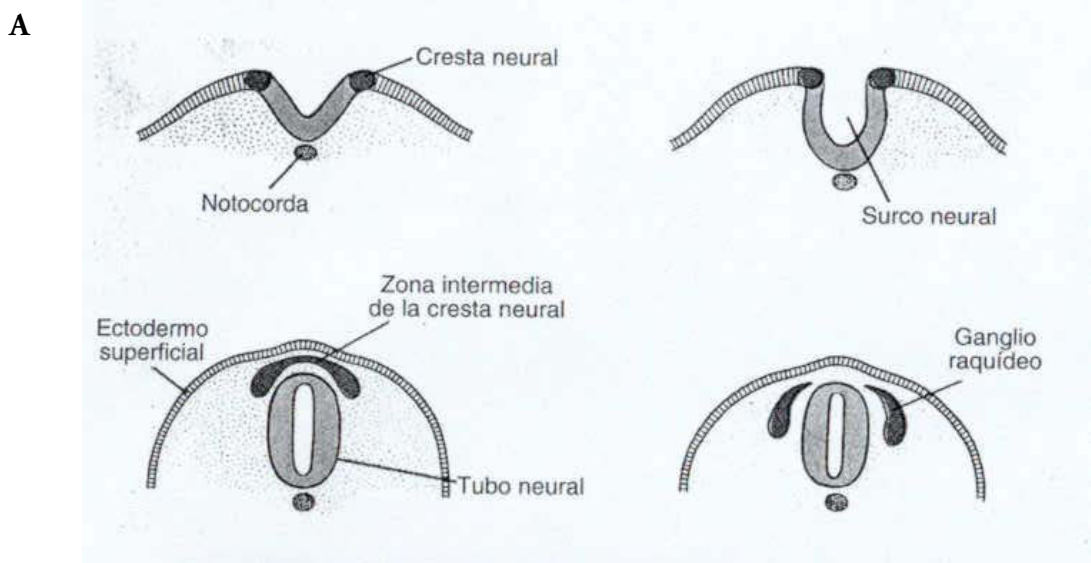
Un altre producte testat és el factor neurotròfic cardiotrofina-1 (CT-1). Mitjançant un vector adenoviral, s'ha injectat intramuscularment a ratolins amb deleció homozigota de l'exó 7 de *Smn* específica de neurones (Frugier T *et al.*, 2000), obtenint-se com a resultat un augment de la vida mitjana dels ratolins, un retard en el defecte motor, i un efecte protector de les neurones motores (Lesbordes JC *et al.*, 2003).

És possible que, en poc temps, es comencin a realitzar assajos clínics amb alguns d'aquests fàrmacs o les seves formes alternatives, així com amb d'altres productes que estan actualment en experimentació.

## B. LA MEDUL·LA, EL MÚSCUL I LA UNIÓ NEUROMUSCULAR DURANT EL DESENVOLUPAMENT HUMÀ

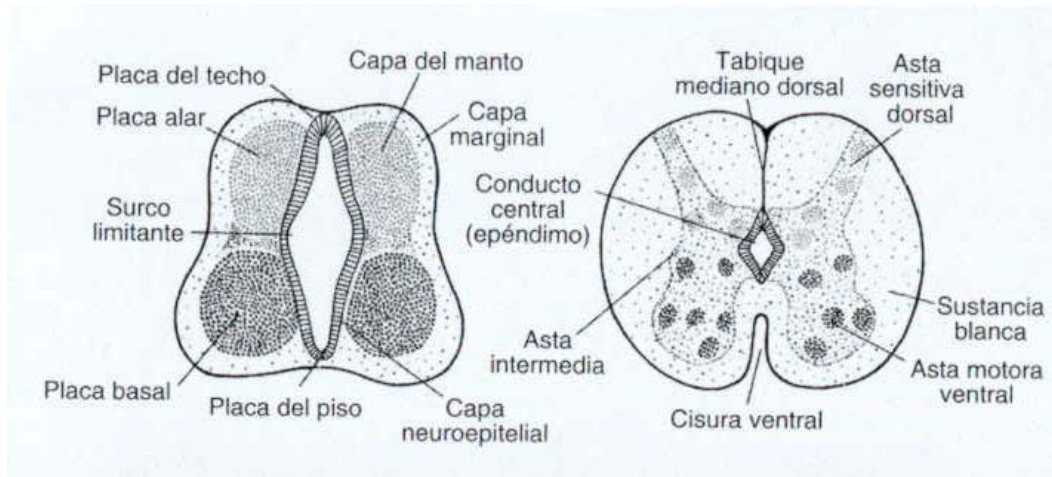
### 1. DESENVOLUPAMENT DE LA MEDUL·LA ESPINAL

El desenvolupament del sistema nerviós central comença a la tercera setmana de vida embrionària. Inicialment, és un engruiximent ectoderm anomenat placa neural, que s'anirà plegant fins a fusionar-se pels extrems i formar el tub neural (Figura 14 A). Aquest està format per cèl·lules neuroepiteliales, que s'estenen per tot el gruix de la paret, formant un epiteli pseudoestratificat. Abans del tancament del tub neural, les cèl·lules s'aniran dividint ràpidament per augmentar el seu nombre, i en conjunt formaran el neuroepiteli. Un cop tancat el tub neural, les cèl·lules neuroepiteliales donaran lloc als neuroblasts, que tenen un nucli de gran tamany, i que es disposen al voltant del neuroepiteli formant la capa del mantell. Aquesta capa, més endavant donarà lloc a la substància gris de la medul·la espinal. En canvi, la capa més externa conté les fibres nervioses que surten dels neuroblasts i s'anomena capa marginal, que és el que formarà la substància blanca (Figura 14 B).



**Figura 14. A.** Talls transversals del desenvolupament embrionari del tub neural (Sadler TW, 1986).

B



**Figura 14. B.** Esquemes que mostren dues etapes successives del desenvolupament de la medul·la espinal. Noteu la formació de les banyes motores ventrals (anteriors) i sensitives dorsals (posteriors) (Sadler TW, 1986).

El fet que el nombre de neuroblasts vagi augmentant a la capa del mantell, fa que a cada cantó del tub neural es vagin formant uns engruiximents, un dorsal i l'altre ventral. Els engruiximents ventrals o plaques basals inclouen a les cèl·lules motores de les banyes anteriors, i formaran així les àrees motores de la medul·la espinal. Els engruiximents dorsals o plaques alars, formaran les àrees sensitives. Aquestes dues àrees es separaran per l'enfonsament del solc limitant. Les porcions dorsal i ventral de la línia mitjana del tub neural no tenen neuroblasts, i serveixen principalment com a vies per a les fibres nervioses que creuen d'un cantó a l'altre de la medul·la espinal. A més a més de les banyes anteriors i posteriors, entre aquestes dues hi ha el que s'anomena banya lateral o intermèdia. És més petita i conté neurones del sistema nerviós autònom, i sols es troben a nivell toràcic i lumbar superior (Figura 14 B) (Sadler TW, 1986; Carlson BM, 2000).

## Diferenciació histològica

**Neuroblasts:** Aquestes cèl·lules nervioses s'originen exclusivament per la divisió de les cèl·lules neuroepitelials. En un principi tenen una prolongació central que s'estén cap a la llum, però en emigrar cap a la zona del mantell, aquesta prolongació desapareix, de manera que els neuroblasts tindran temporalment una forma circular. Són els neuroblasts apolars. En continuar la diferenciació, apareixen dues noves prolongacions citoplasmàtiques oposades, formant-se un neuroblast bipolar. Una de les prolongacions s'allarga molt ràpidament formant l'axó primitiu, mentre que l'altra presenta unes ramificacions citoplasmàtiques anomenades dendrites primitives. En aquesta etapa, la cèl·lula s'anomena



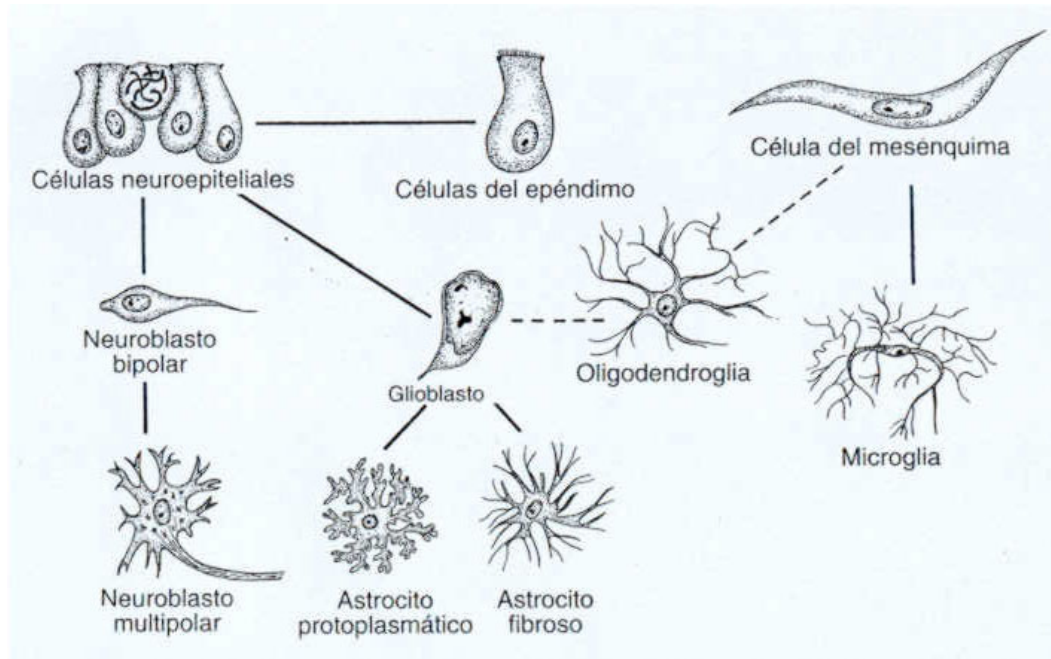
neuroblast multipolar, que anirà desenvolupant-se fins a formar la cèl·lula nerviosa adulta o neurona. Un cop formats, els neuroblasts perden la capacitat de dividir-se (Figura 15). Els axons de les neurones de la placa basal travessen la zona marginal fins a la superfície ventral de la medul·la espinal. Tot el conjunt d'axons reben el nom d'arrel motora ventral del nervi raquidi o espinal, i condueixen els impulsos motors de la medul·la espinal cap als músculs. En canvi, els axons de les neurones sensibles penetren a la capa marginal de la medul·la, a on tindran una funció d'associació.

**Cèl·lules de la glia:** Les cèl·lules neuroepiteliales, un cop han deixat de produir els neuroblasts, donaran lloc als glioblasts, a partir dels quals es formaran les cèl·lules de la glia. Els glioblasts migraran cap a la capa del mantell i la marginal. Un cop estiguin a la capa del mantell, es diferenciaran en astròcits protoplasmàtics i fibrosos. Contribuiran en el suport estructural de les neurones, i en la reparació del teixit del sistema nerviós central després de lesions o processos patològics.

Pel que fa a l'oligodendroglia, el seu origen ha estat molt discutit, però finalment s'ha demostrat que també provenen dels glioblasts. Les cèl·lules de l'oligodendroglia formaran les beines de mielina que envolten els axons de la capa marginal. Aquesta mielinització començarà aproximadament durant el quart mes de vida intrauterina, tot i que hi ha algunes fibres que no es mielinitzaran fins el primer any de vida postnatal i ho faran a mida que comencin a ser funcionals. Aquestes descendeixen dels centres cerebrals superiors fins a la medul·la espinal.

Existeix un tercer tipus cel·lular que apareixerà a la segona meitat de la vida intrauterina. Aquestes són les cèl·lules de la microglia, que deriven del mesènquima i constitueixen el sistema de defensa fagocitari mononuclear.

**Cèl·lules endimàries:** Un cop les cèl·lules neuroepiteliales deixen de produir neuroblasts i glioblasts es diferencien en cèl·lules endimàries, que tapissaran el canal central de la medul·la espinal (Figura 15) (Sadler TW, 1986).



**Figura 15.** Esquema que mostra l'origen de les neurones i els diferents tipus de cèl·lules de la glia. Les cèl·lules neuroepiteliales originen els neuroblasts, astròcits i cèl·lules endimàries. La microglia es desenvolupa a partir de les cèl·lules del mesènquima. L'origen de l'oligodendroglia és dubtós (Sadler TW, 1986).

## 2. DESENVOLUPAMENT DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC:

### Extremitats

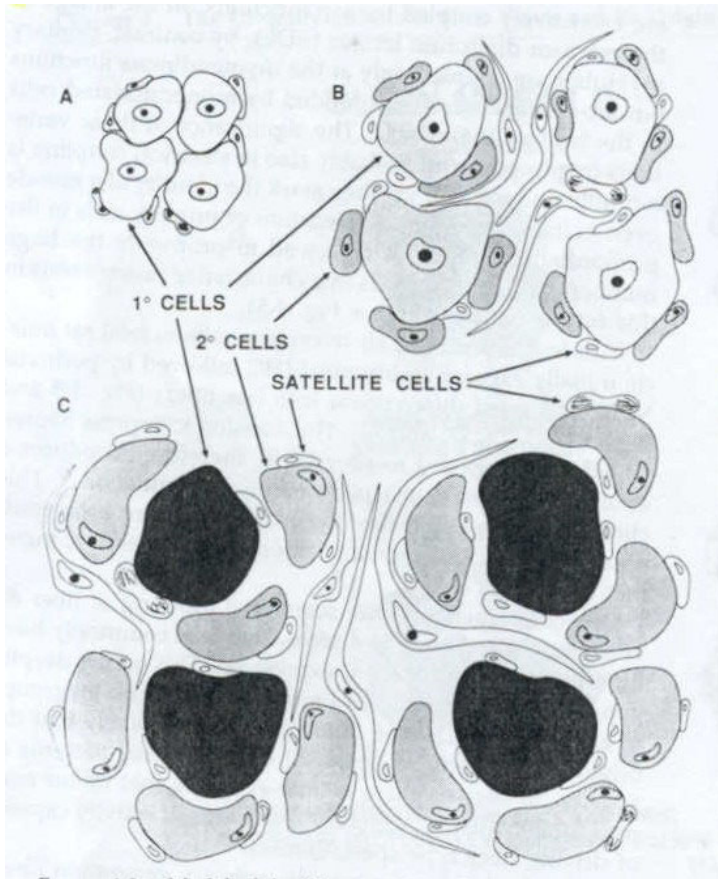
Els primers indicis de formació de la musculatura de les extremitats apareixen a la setena setmana del desenvolupament. S'inicia amb una condensació del mesènquima, que es troba proper a la base dels esbossos del que seran les extremitats. Els esbossos s'aniran allargant i el teixit muscular es dividirà en els components flexors i extensors. En un inici, aquests músculs són segmentaris, però amb el temps es fusionaran.

Els esbossos de les extremitats superiors es troben al cantó oposat als cinc segments cervicals inferiors i els dos toràcics superiors. Els dels membres inferiors estan davant dels quatre lumbar inferiors i els dos sacres superiors. Els nervis raquidis s'introduiran al mesènquima un cop s'hagin format els esbossos de les extremitats. En un inici arriben formant branques dorsals i ventrals aïllades, però aviat s'uniran per a formar els nervis dorsals (extensors) i ventrals (flexors) amb un gruix important. Immediatament després de que els nervis entrin als esbossos de les extremitats, es posen en contacte íntim amb les

condensacions mesodèrmiques en diferenciació. Aquest contacte entre el nervi i les cèl·lules musculars en vies de diferenciació és el requisit previ per a la seva completa diferenciació funcional (Sadler TW, 1986).

## Diferenciació histològica

El múscul esquelètic està constituït principalment per les fibres musculars. Aquestes són cèl·lules multinucleades d'origen mesodèrmic. Inicialment, en el teixit muscular es troben els mioblasts, que són les primeres cèl·lules potencialment miogèniques, que tenen un sol nucli i la capacitat de dividir-se. La seva forma és allargada, s'alineen longitudinalment i es fusionen les unes amb les altres per a formar unes cèl·lules multinucleades anomenades miotubs. Tenen els miofilaments organitzats en miofibril·les i els nuclis disposats en cadena al llarg de la cèl·lula. En un inici, aquests miotubs estan units per les unions gap (*gap junctions*) i funcionen com un sincici elèctric. Seran la generació primària de miotubs. Posteriorment, les unions entre aquestes cèl·lules es trenquen i es separen. Al mateix temps, apareixen nous mioblasts al voltant de les cèl·lules primàries, que utilitzaran les membranes dels miotubs com a suport per a diferenciar-se en miotubs secundaris. Les unions gap interconnectaran els dos ordres de miotubs formant grups, de manera que actuaran com a una unitat individual, estant delimitada per una làmina basal (Figura 16). Cada un d'aquests grups amb els seus miotubs primaris i secundaris serà innervat inicialment per múltiples axons com si fos una unitat. Amb el creixement successiu, les unions gap entre les cèl·lules primàries i les secundàries es trencaran i les cèl·lules es segregaran les unes de les altres. Cada un dels miotubs s'anirà envoltant d'una làmina basal individual i es diferenciarà en una fibra muscular i unitat de contracció independent. Mentre que la generació de miotubs primaris és independent de la innervació, l'inici del desenvolupament dels miotubs secundaris depèn estrictament de la innervació i de l'activitat muscular. El nervi aportarà l'entorn necessari per a la miogènesi (Figura 17). En la seva diferenciació, els miotubs seran més rics en miofibril·les i els seus nuclis aniran migrant cap a la perifèria. Cap a finals del tercer mes de gestació apareixen les estries típiques del múscul esquelètic.

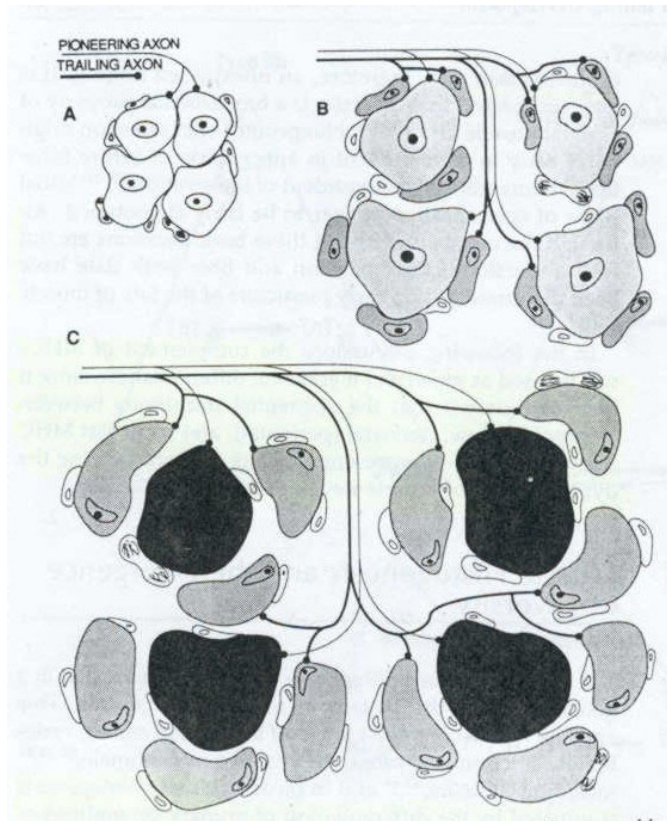


**Figura 16.** Model d'histogènesi i especialització al múscul fetal humà. Representació en secció transversal. Les cèl·lules amb el nucli central són els miotubs. **A.** Múscul d'extremitat fetal de 9-10 setmanes de gestació. En un inici es formen grups de quatre miotubs envoltats per mioblasts en divisió. En aquest estadi, les cèl·lules primàries expressen cadenes pesades de miosina (*Myosin Heavy Chains*; MHC) embrionàries i lentes. **B.** Acoblament progressiu de les cèl·lules a un fetus d'entre 13 i 18 setmanes de gestació. Els miotubs han augmentat de mida i es

separen. Expressaran MHC lentes. Estan envoltats per mioblasts i per una segona generació de miotubs. Aquestes cèl·lules secundàries expressaran MHC embrionàries i perinatals, però no les lentes. La majoria es diferenciarien en fibres ràpides. **C.** Creixement entre 20 i 22 setmanes de gestació. Tant les fibres primàries com secundàries es separen. La formació de les fibres ja s'ha completat (Kelly AM i Rubinstein NA., 1994).

Aquells mioblasts que no s'hagin diferenciat romandran a les parets de les fibres musculars envoltats per la mateixa làmina basal. Reben el nom de cèl·lules satèl·lit, tenen un nucli ric en heterocromatina i contribuiran al creixement de la fibra a través de la seva fusió. Això succeeix en certes circumstàncies, tant normals com patològiques.

Com a resultat d'aquest patró temporal d'histogènesi, les fibres primàries i secundàries que expressen proteïnes contràctils diferents, es barregen formant un mosaic de fibres de diferents tipus (Kelly AM i Rubinstein NA, 1994).



**Figura 17.** Esquema de l'acoblament successiu de les unitats motores durant l'histogènesi del múscul. **A.** Un axó pioner innerva quatre miotubs primaris. Un altre axó d'una neurona motora en un estadi de diferenciació més primerenc encara no ha trobat els seus miotubs diana. **B.** En aquest estadi, cada grup de miotubs primaris/secundaris és innervat per neurones en diferents estadis de desenvolupament. **C.** Aquí ja s'han diferenciat les fibres primàries i secundàries i formaran un mosaic. La innervació polineural ja s'ha eliminat. Els axons pioners innervaran les fibres lentes primàries com a una unitat i els axons més tardans innervaran les fibres

secundàries, que seran les grans unitats motores ràpides (Kelly AM i Rubinstein NA, 1994).

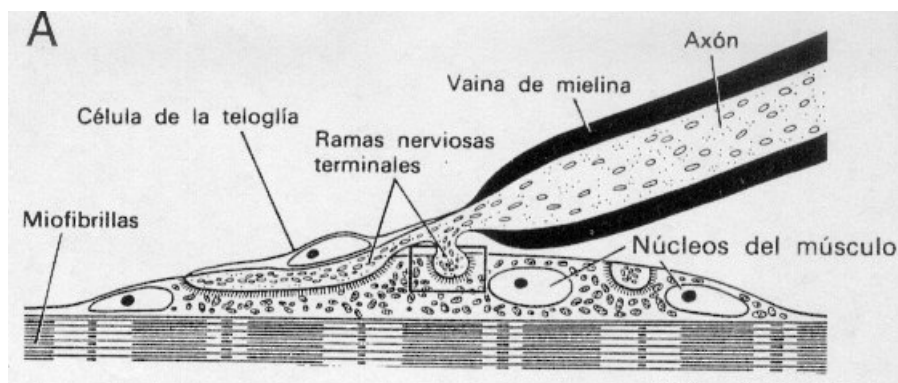
### 3. LA UNIÓ NEUROMUSCULAR

La unió que es dona entre una fibra nerviosa motora i una fibra muscular s'anomena unió neuromuscular (UN). És una sinapsi química que està anatomicament i funcionalment diferenciada per tal que es doni la transmissió d'un senyal des de la part nerviosa a la muscular. El nombre i posició de les UN dependrà del múscul i del tipus de fibres musculars. Totes tindran però, cinc components principals:

1. Una cèl·lula de Schwann que formarà un recobriment per sobre de la porció terminal del nervi.
2. Un nervi terminal que conté el neurotransmissor. La membrana limitant s'anomena membrana presinàptica.
3. Un espai sinàptic amb membrana basal.
4. Una membrana postsinàptica que conté els receptors per al neurotransmissor. Aquesta membrana formarà uns plects, únics en aquest tipus de sinapsi, que amplificaran la seva superfície.

5. Un sarcoplasma d'unió que proporciona un suport metabòlic i estructural per a la regió postsinàptica.

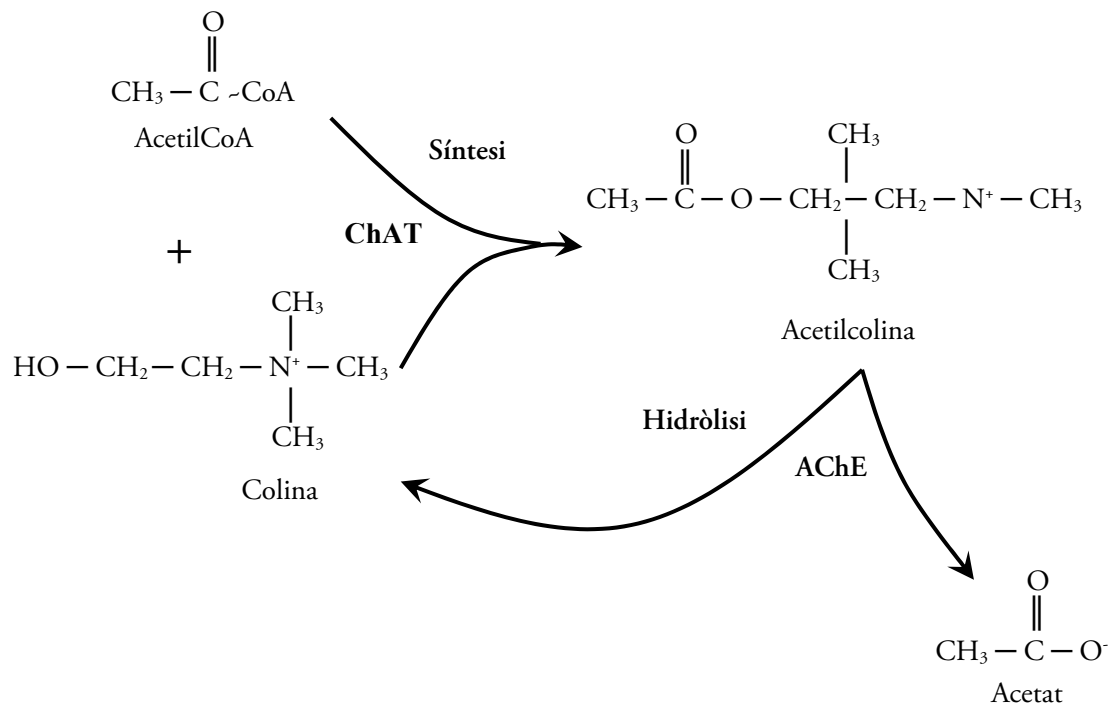
En la sinapsi química, els impulsos nerviosos són transmesos gràcies a l'alliberament a l'espai sinàptic, d'uns missatgers químics anomenats neurotransmisors. Als vertebrats, el neurotransmissor que s'utilitza en el moviment muscular voluntari és l'acetilcolina (ACh), el receptor és el nicotínic (AChR) i a l'espai sinàptic hi ha l'enzim acetilcolinesterasa (AChE) (Figura 18) (Engel AG, 1994).



**Figura 18.** Representació esquemàtica de la unió neuromuscular (Fawcett DW, 1987).

## 4. EL NEUROTRANSMISOR: ACETILCOLINA

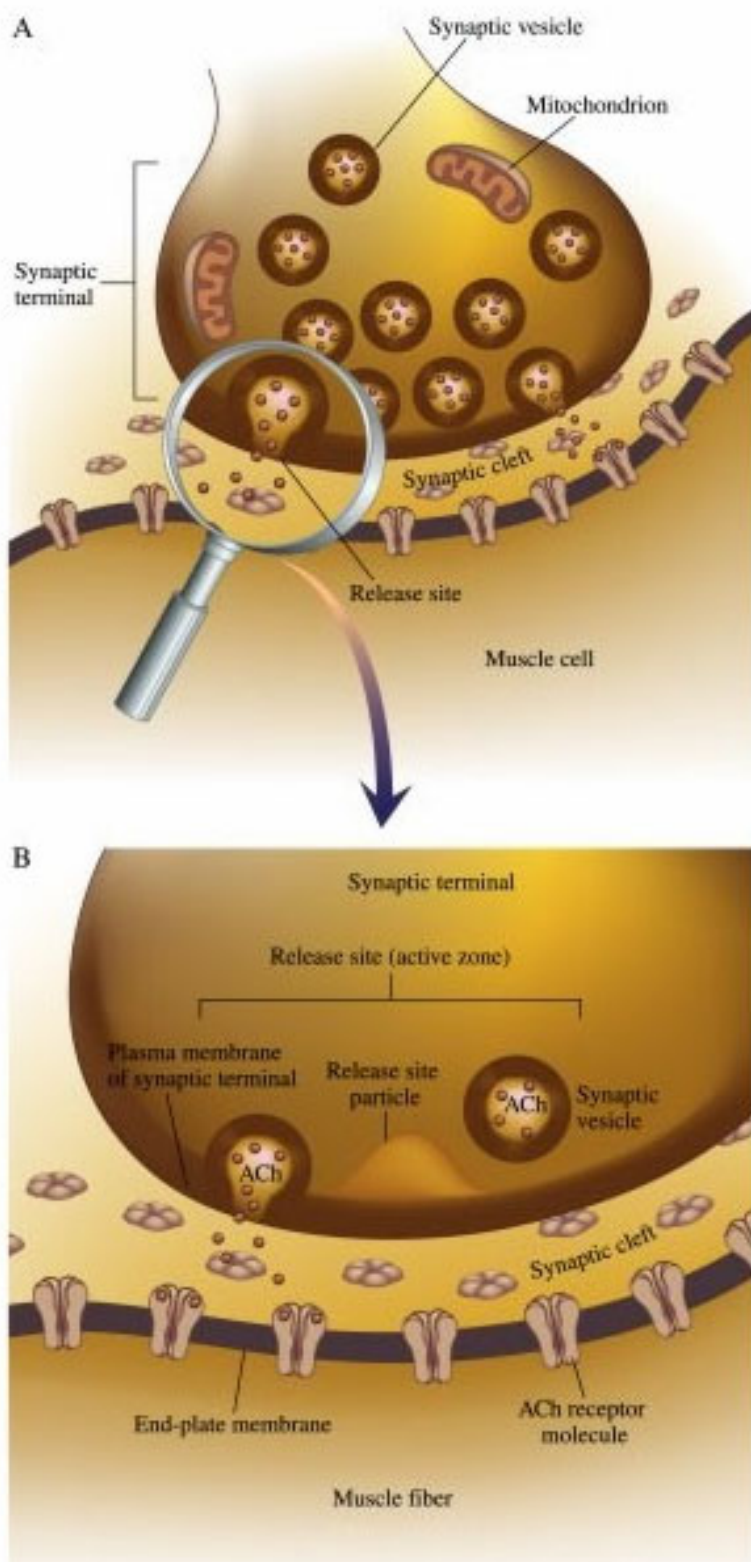
L'acetilcolina fou el primer neurotransmissor químic aïllat i caracteritzat tant estructuralment com funcionalment. Totes les vies nervioses que utilitzen l'acetilcolina com a transmissor químic s'anomenen colinèrgiques i actuen en les respostes ràpides. Les neurones colinèrgiques es troben principalment a l'escorça cerebral, als nuclis motors, al cervell anterior basal (*basal forebrain*) i a la medul·la espinal. La síntesi de l'acetilcolina es dona al citoplasma de les terminacions nervioses a partir de l'acetat activat i la colina, en una reacció catalitzada per l'enzim colina acetiltransferasa (ChAT), prèviament sintetitzat en el soma cel·lular i enviat a les terminacions nervioses a través del flux axoplàsmic (Figura 19).



**Figura 19.** Síntesi i hidròlisi de l'acetilcolina (<http://www.blackwellpublishing.com/matthews/>).

L'ACh es troba majoritàriament dins d'unes vesícules. Aquestes es sintetitzen al soma de les neurones motores de la medul·la espinal o de les cèl·lules mare del cervell. Després, amb l'ajuda dels microtúbuls, són transportades a la terminació nerviosa, a on s'alliberarà l'ACh, es tornaran a formar les vesícules i s'aniran omplint repetides vegades (Figura 20).





**Figura 20.** Diagrama del procés d'alliberament de les vesícules sinàptiques a l'espai sinàptic i posterior activació dels receptors de l'acetilcolina.  
(<http://www.blackwellpublishing.com/matthews/>).

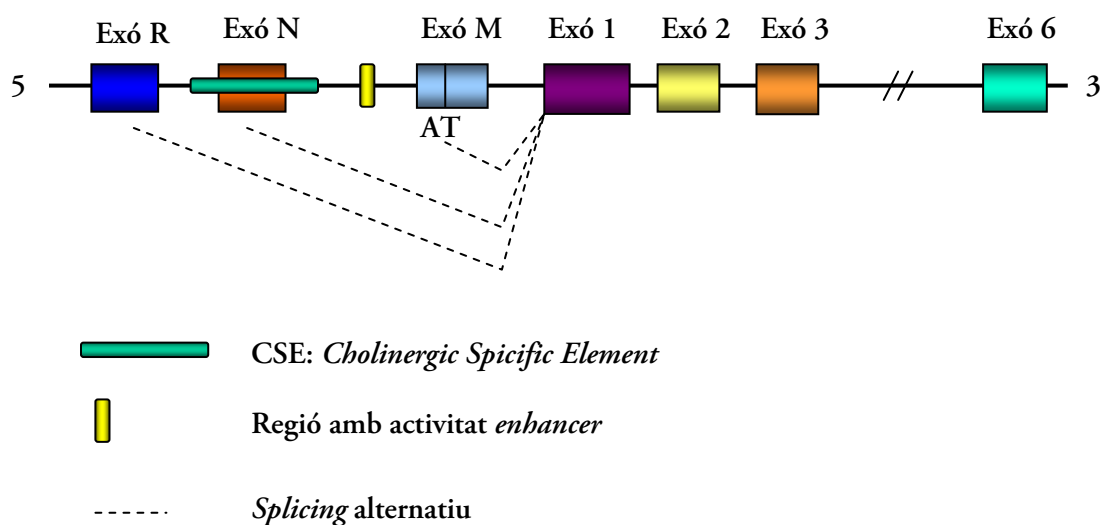
Quan un potencial d'acció arriba al botó terminal d'una neurona presinàptica, s'estimula l'exocitosi de les vesícules que contenen ACh. Aquesta entrarà en contacte amb els seus receptors situats a la membrana postsinàptica, de manera que es produirà un



intercanvi iònic i una despolarització de la membrana, que comportarà resposta d'excitació-contracció i per tant una activitat muscular. Un cop l'ACh ha actuat, serà hidrolitzada ràpidament per l'AChE per tal que es pugui donar una repolarització (Giménez C *et al.*, 1991; Engel AG, 1994).

## 5. LA COLINA ACETILTRANSFERASA (ChAT)

La colina acetiltransferasa (ChAT; EC 2.3.1.6) és l'enzim limitant en la síntesi de l'acetilcolina, per tant, determinarà la funcionalitat colinèrgica de les neurones, essent doncs un bon marcador de l'estat funcional d'aquestes cèl·lules. El fenotip colinèrgic s'adquireix progressivament a mida que augmenta l'expressió del gen *ChAT* durant el desenvolupament. A les neurones motores de la medul·la espinal, els nivells de mRNA de *ChAT* augmenten lentament durant la vida embrionària, i més ràpidament després del naixement, arribant als nivells màxims en l'adult. Les neurones en desenvolupament adquiriran el fenotip colinèrgic un cop hagin assolit la seva diana d'innervació. També ho faran en resposta a un dany. Un punt important en el control del fenotip colinèrgic és el transcripcional, de manera que pot haver elements reguladors en el gen *ChAT* que controlen l'expressió tant en el temps com en l'espai. Localitzat a la regió 5', es troba un potent *enhancer*, i en una posició encara més distal, podem trobar un element específic colinèrgic negatiu (CSE: *Cholinergic Specific Elements*). Aquesta regió confereix a la cèl·lula l'expressió colinèrgica específica (Figura 21) (revisat per Wu D i Hersh LB, 1994).



**Figura 21.** Esquema de l'organització genòmica de la regió 5' del gen *ChAT* humà (modificat de Wu D i Hersh LB, 1994; Robert I i Quirin-Stricker C, 2001).

El gen *ChAT* conté varis exons, dels quals, els tres situats a l'extrem 5' són no codificants. En humans s'han identificat quatre transcrits que provenen de l'*splicing* alternatiu dels exons i s'expressaran segons les necessitats. Tres dels transcrits, *R*, *N1* i *N2*, codifiquen per una proteïna de 69 kDa, mentre que el transcrit *M* té dos llocs d'inici de traducció de manera que codificarà també per una proteïna de 82 kDa. Les dues proteïnes es diferencien en 118 residus a N-terminal (Misawa H *et al.*, 1997; Oda Y *et al.*, 1992). Encara no estan clars quins són els mecanismes que regulen la producció dels diferents transcrits i quins són els seus papers fisiològics. Es pensa però, que podrien tenir diferències en quant a l'estabilitat, eficiència traduccional o una expressió diferent en resposta a factors tròfics o hormones (Dobransky T *et al.*, 2000). Pel que fa a les proteïnes, tampoc se sap si les dues isoformes tenen papers fisiològics diferents o estan regulades per mecanismes cel·lulars diferents.

La proteïna ChAT és una proteïna globular de càrrega positiva. A la terminació nerviosa, la isoforma de 69 kDa està localitzada principalment de forma lliure al citoplasma, però part de l'enzim es troba unit a la mitocòndria, a les vesícules sinàptiques i a la superfície interna de la membrana plasmàtica mitjançant interaccions electrostàtiques (revisat per Wu i Hersh, 1994). En canvi, la isoforma de 82 kDa, s'ha vist que es localitza al nucli (Resendes MC *et al.*, 1999).

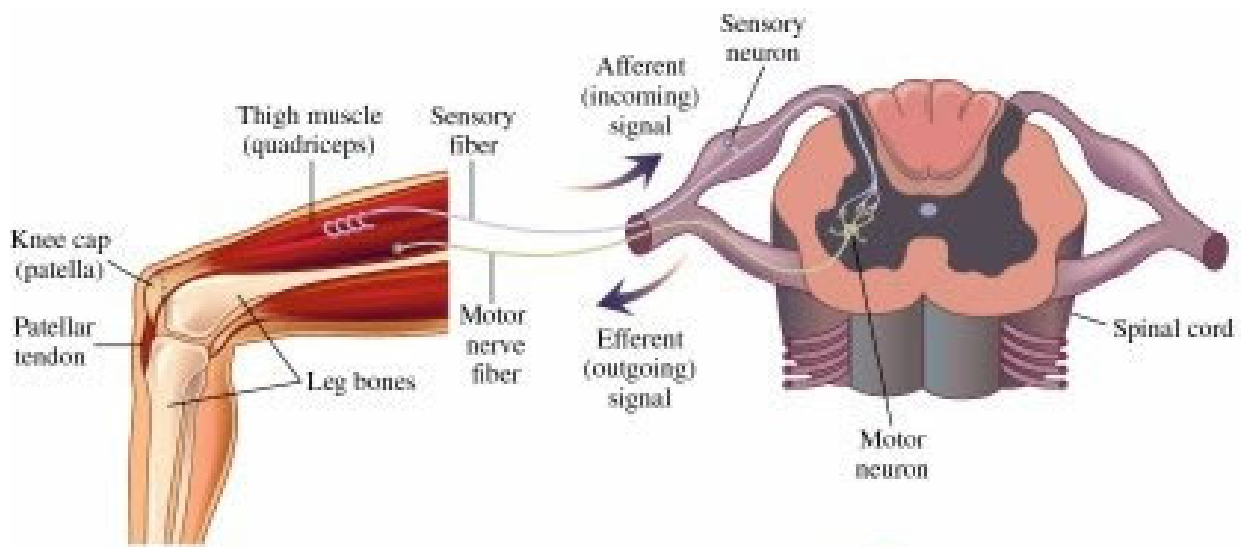
Pel que fa a l'expressió de la ChAT, podem dir que es dona a diverses estructures del sistema nerviós central, com són la medul·la espinal (neurones motores de la banya anterior), nucli motor cranial, escorça cerebral, nucli estriat i cervell anterior basal (*basal forebrain*) (revisat per Oda Y i Nakanishi I, 2000). Per altra banda, també podem trobar expressió de ChAT a teixits no neuronals com ara placenta (Bruce G *et al.*, 1985), espermatozoides (Ibáñez CF *et al.*, 1991), limfòcits T (Fujii T *et al.*, 1999) i d'altres.

## 6. FUNCIONS: EL REFLEX ELEMENTAL

Cada segment de la medul·la espinal amb el seu parell de nervis raquidis té el paper de centre reflex elemental. A través de les arrels posteriors arribaran els senyals nerviosos cap a les neurones sensibles. En canvi, els senyals efectors sortiran per les arrels anteriors passant per la banya anterior. Qualsevol estímul perifèric, per tal d'arribar a la substància gris de la medul·la espinal, ha de passar per una cèl·lula anomenada protoneurona sensible. El cos d'aquesta neurona està situat fora de l'eix neuronal, al gangli espinal situat a l'arrel posterior (Figura 22). Els estímuls que arriben de la perifèria fins a la medul·la provocaran una resposta, ja sigui motora o secretora. Per això, la protoneurona sensible s'ha d'articular amb una altra neurona, que s'encarregarà de tornar l'excitació que va rebre de la primera.

Aquesta neurona efectora serà una neurona motora, que estarà situada a la banya anterior de la medul·la espinal. La neurona motora emetrà una prolongació que sortirà per l'arrel anterior. Tant l'arrel anterior com la posterior es fusionaran formant el que s'anomena nervi raquidi, essent aquest un nervi mixt, amb fibres nervioses sensibles i motores. Un cop a la perifèria, les arrels es separen per arribar als òrgans efectors o als teguments, els quals representen, respectivament, els punts d'arribada i de sortida. Això serà doncs, l'arc reflex més senzill, el centre funcional del qual està representat per la substància gris de cada segment medul·lar. És necessària però, l'existència de les interneurons que serviran de nexa d'unió entre les neurones sensibles i motores. D'aquesta manera, s'aconseguiran respostes més fines i adients pels fenòmens biològics. Les interneurons tenen la capacitat de conservar el record dels influxos que l'han atravesat, moderar la seva intensitat i disminuir la seva velocitat (Delmas J i Delmas A, 1965).

Una de les manifestacions més importants i primerenques de l'AME és la hiporeflèxia o areflèxia, fonamentalment de les extremitats, indicant la manca de resposta de les neurones motores de la banya anterior.



**Figura 22.** Arc reflex elemental (<http://www.blackwellpublishing.com/matthews/>).

## C. LA MORT CEL·LULAR

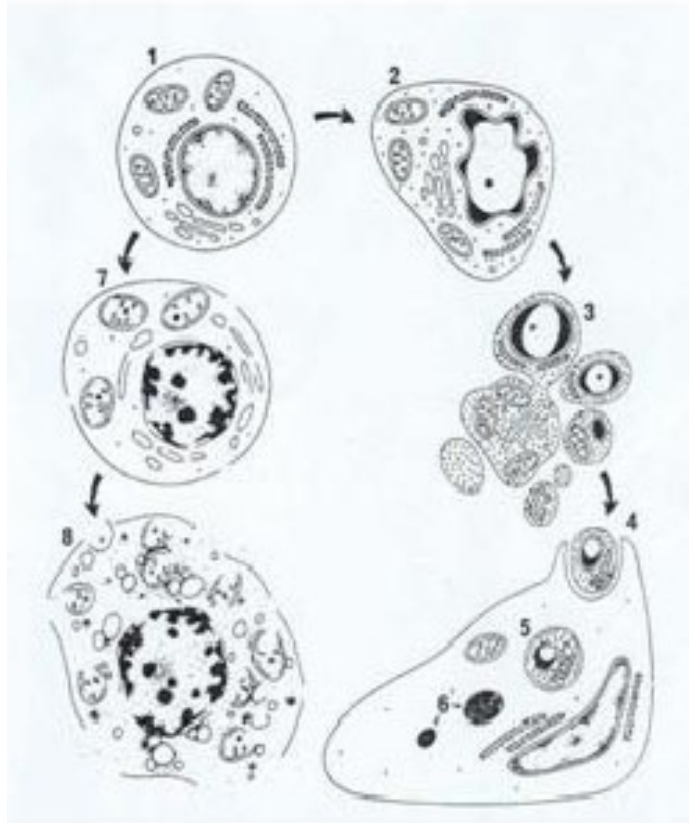
### 1. TIPUS DE MORT CEL·LULAR

La mort cel·lular juga un paper important en la vida dels organismes, ja sigui durant el desenvolupament, com en el manteniment de l'homeòstasi. Serà el mecanisme regulador del fenotip i del nombre de cèl·lules que conformen els teixits. Per altra banda, les cèl·lules poden patir agressions externes irreversibles, i d'aquesta manera esdevenir-se la mort cel·lular per lesió severa dels teixits. Els tipus de mort cel·lular que podem trobar es classifiquen per les seves característiques morfològiques. Bàsicament hi ha dos tipus: la necrosi i l'apoptosi. Hi ha autors però, que defensen l'existència d'altres formes de mort amb característiques intermèdies, i fins i tot diferents a les de les dues anteriors. Que es doni un tipus o un altre de mort cel·lular dependrà de diferents factors que s'explicaran a continuació.

#### Necrosi

La necrosi és una forma patològica de mort cel·lular que resulta d'un dany irreversible. Es caracteritza per una dilatació del citoplasma amb la consegüent ruptura de les membranes cel·lulars, una posterior lisi de la cèl·lula i alliberament del material citoplasmàtic al medi, que induirà una resposta inflamatòria. En el reconeixement morfològic per microscòpia òptica, s'identifica una cromatina homogènia dèbilment tenyida, amb un citoplasma granular finament vacuolat i una pèrdua de basofília. Cal destacar que, el procés de mort tissular per necrosi afecta a un grup de cèl·lules al centre de la lesió i a cèl·lules veïnes, originant el fenomen d'infiltració leucocitària neutròfila o de fagòcits mononuclears. Les cèl·lules necròtiques tendeixen a mantenir la seva forma fins a ésser eliminades pels macròfags. A nivell de microscòpia electrònica, la necrosi es caracteritza per la floculació moderada de la cromatina nuclear i la seva marginació en petits i indefinits agregats, així com per l'inflament de tots els compartiments citoplasmàtics amb ruptura i/o dissolució del citoplasma, dels orgànuls i membrana nuclear (Figura 23). Bioquímicament, el DNA de les cèl·lules necròtiques es fragmenta, de manera irregular o a

l'atzar, en nombroses partícules sense un patró definit per endonucleases (revisat per Cohen JJ, 1993 i Majno G i Joris I, 1995).



**Figura 23.** Diagrama que il·lustra els canvis ultraestructurals seqüencials a la necrosi (esquerra) i l'apoptosi (dreta). A la il·lustració (1) es mostra una cèl·lula normal. L'inici de l'apoptosi (2) va precedit per una compactació i segregació de la cromatina contra la membrana nuclear i la condensació del citoplasma. La ràpida progressió del procés (3) s'associa amb la fragmentació nuclear i intensa circumvolució de la superfície cel·lular amb desenvolupament de protuberàncies. Aquestes últimes es separen per produir cossos apoptòtics units a la membrana, que són fagocitats i digerits per les

cèl·lules adjacents (4). Els signes de necrosi consisteixen en (5) aglutinació de la cromatina en masses mal definides, gran inflament dels orgànul, aparició de densitats floculentes a la matriu mitocondrial, i finalment lesió de la membrana (revisat per Kerr JF i Harmon BV, 1991).

## Apoptosi

És un tipus de mort cel·lular que es dona a través de l'activació d'un complex programa genètic. Serà doncs, un procés actiu. Està present a pràcticament totes les cèl·lules de mamífers i té una funció complementària i oposada a la proliferació cel·lular. A diferència de la necrosi, l'apoptosi es dona en cèl·lules aïllades i distribuïdes en una àrea determinada. Els canvis morfològics que es donen s'esdevenen en dues etapes. Primer, hi ha una condensació nuclear i citoplasmàtica, i posterior ruptura de la cèl·lula en nombroses vesícules estructuralment preservades anomenades cossos apoptòtics. Seguidament, els cossos apoptòtics seran fagocitats per macròfags o cèl·lules epitelials adjacents, de manera que s'impedeix l'alliberament del contingut citoplasmàtic i així s'impossibilita la resposta inflammatòria (Figura 23). Mitjançant el microscopi òptic i una simple tinció d'hematoxilina-eosina, es pot observar la condensació i fragmentació de la cromatina, així

com els cossos apoptòtics. De tota manera, l'evidència morfològica definitiva de que estem davant d'un procés apoptòtic ens la dona l'anàlisi ultraestructural. Les característiques que s'observen són una preservació temprana dels orgànuls intracel·lulars, i de les membranes nuclear i citoplasmàtica. La condensació i fragmentació de la cromatina fa que aparegui com una estructura negra amb els marges ben definits, i una localització marginal dins de l'espai nuclear (revisat per Kerr JF *et al.*, 1972, Cohen JJ, 1993 i Majno G i Joris I, 1995).

Wyllie A va demostrar que durant l'apoptosi, es dona l'activació d'un enzim endonucleasa endògen, que talla el DNA genòmic durant el procés de condensació de la cromatina. Crearà fragments internucleosomals de DNA, amb una mida entre els 180 i 200 parells de bases, que es poden observar en una electroforesi en gel d'agarosa (Wyllie A, 1980). Aquesta és una característica important de l'apoptosi, que ha servit per desenvolupar altres tècniques que permetran identificar-la. Aquest és el cas de la tècnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*), portada a terme per Gavrieli Y *et al.* (1992). Durant el procés de fragmentació de la doble cadena de DNA queden grups hidroxils (3'OH) terminals exposats, de manera que s'hi podran incorporar nucleòtids marcats amb biotina. Aquesta reacció ve catalitzada per l'enzim transferasa terminal de deoxinucleòtids (TdT), que sintetitzarà un polímer de dUTP-biotina. En incorporar el conjugat proteic avidina-peroxidasa es donarà la unió de la biotina amb l'avidina, de manera que en afegir diaminobencidina (DAB) a la reacció, gràcies a la peroxidasa, es produirà un precipitat marró que ens permetrà determinar quines cèl·lules tenen el seu nucli fragmentat.

Existeix una variant a la tècnica de TUNEL, i és la ISEL (*In Situ End-Labeling*) (Wijsman JH *et al.*, 1993). Tot i que aquestes dues tècniques ens permetran visualitzar nuclis fragmentats, la interpretació d'un resultat positiu s'ha de fer amb precaució, ja que el marcatge del grup hidroxil per TUNEL o ISEL no és selectiu per aquest tipus de mort (Charriaut-Marlangue C i Ben-Ari Y, 1995). És per això que resulta important tenir el compte els canvis morfològics característics de l'apoptosi. El que sí que ens indicaran aquestes tècniques és la vulnerabilitat del DNA nuclear, per tant ens donarà una idea de l'estat de les cèl·lules.

## 2. MECANISMES D'APOPTOSI

Les cèl·lules de l'organisme patiran el procés de mort programada en el moment que els manquin els factors de supervivència. Això comporta que tots els mecanismes de mort han d'estar permanentment a punt per actuar, fins i tot encara que no hi hagi transcripció de nous gens o síntesi de noves proteïnes.

L'apoptosi es pot dividir en tres etapes de senyalització cel·lular diferents: iniciació, efectora i degradació. La iniciació dependrà del tipus d'estímul inductor (toxines, pèrdua de factors de supervivència,  $\alpha$ -TNF, etc.) i del model de cèl·lula que rep l'estímul. En canvi, les etapes efectora i de degradació seran comuns a tots els processos apoptòtics. Durant l'etapa efectora, es dona l'activació de les proteïnes de la família Bcl-2. Són proteïnes reguladores de l'apoptosi, entre les que n'hi ha que són antiapoptòtiques (ex. Bcl-2) i proapoptòtiques (ex. Bax). Aparentment, una cèl·lula "decidirà" morir o viure segons la dominància d'un tipus de proteïnes o d'altres. En aquesta etapa també intervenen els factors de transcripció, que s'uniran al DNA i regularan la transcripció de gens que intervenen en l'apoptosi. Aquests són el factor nuclear kappa B (FN- $\kappa$ B), p53, *c-Jun* i *c-Fos*. Finalment, durant l'etapa de degradació es dona l'activació d'una família de proteases anomenades caspases (cisteïn proteases que tallen després de l'àcid aspàrtic). Són sintetitzades com a zimògens (inactives) i s'activen per una cascada intracel·lular de proteases. Un cop activades, tallaran polipèptids estructurals, tant del citoplasma com del nucli, i components de la maquinària de reparació del DNA. La detecció de l'activació d'aquestes proteïnes també ens servirà per a identificar les cèl·lules apoptòtiques (revisat per Rubin LL, 1997 i Wyllie AH, 1997).

### **3. MORT CEL·LULAR DURANT EL DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL**

Durant el desenvolupament dels organismes, ocorre de manera fisiològica el que s'anomena mort cel·lular programada. Es dona en processos com l'organogènesi, l'eliminació de cèl·lules autoimmunes, formació de gamets, etc. (revisat per Jacobson MD *et al.*, 1997). Aquest tipus de mort té lloc de forma definida tant en el temps com en l'espai. Cal distingir els termes d'apoptosi i de mort cel·lular programada. L'apoptosi fa referència a tota una sèrie d'esdeveniments amb unes característiques morfològiques concretes. En canvi, quan ens referim a la mort cel·lular programada estem parlant d'un tipus de mort cel·lular que té lloc durant el desenvolupament, de manera que és reproduïble a individus de la mateixa espècie, amb un patró i localització definits. Nombrosos estudis apunten a que el tipus majoritari de mort cel·lular programada, que es dona durant el desenvolupament és l'apoptòtica, tot i que existeixen altres tipus morfològics de mort, com són l'autofagocitosi i l'heterofagocitosi (revisat per Oppenheim RW, 1991; Schwartz LM *et al.*, 1993). Independentment de la morfologia que s'adopti, la capacitat de qualsevol cèl·lula per portar a terme la mort cel·lular programada requereix tres processos seqüencials: (a) rebre un senyal de mort; (b) activar la maquinària endògena de mort; (c) ser eliminada durant o després de la mort (revisat per Milligan CE i Schwartz LM, 1997).

En el sistema nerviós dels vertebrats en desenvolupament, l'apoptosi ja s'observa en la formació del tub neural, i persisteix durant tota la diferenciació de la xarxa neuronal. Durant aquest procés moren més del 50% de les neurones, de manera que es limita el nombre d'aquestes i es permeten interconnexions òptimes entre elles mateixes i amb la glia. Aquest fet es pot explicar gràcies a la teoria neurotròfica, segons la qual, la mort massiva de neurones durant el desenvolupament es dona com a resultat d'una limitació tròfica. Sols una proporció de les neurones disposarà del suplement neurotròfic necessari per a sobreviure. En un inici, es produeixen molts tipus de neurones en excés, i la supervivència d'aquestes neurones dependrà de factors neurotròfics específics secretats per les cèl·lules que innerven. Aquest mecanisme assegura que no hi hagi innervacions incorrectes, de tal manera que tan sols trobarem sinapsis adients. També s'aconsegueix que totes les cèl·lules diana siguin innevades, i així s'assoleix una correspondència proporcional entre el nombre de neurones i de cèl·lules diana (revisat per Oppenheim RW, 1991 i Raff MC *et al.*, 1993).

Existeixen un gran nombre de factors neurotròfics que promouen la supervivència neuronal, com la família dels NGF (*Nerve Growth Factor*), les neurokines, i les IGF-I i IGF-II (*Insulin-like Growth Factors*) (Lindsay RM, 1995). Ara se sap que el control de la supervivència neuronal no sols depèn de la disponibilitat de molècules tròfiques procedents de les cèl·lules diana, sinó que també intervien l'activat cel·lular, factors humorals, i el suport tròfic procedent de la glia (revisat per Raff MC *et al.*, 1993).

## 4. LA FAMÍLIA BCL-2

Les proteïnes de la família Bcl-2 són unes de les més rellevants pel que fa a la regulació de l'apoptosi, actuant en la fase efectora de la mateixa. El gen *bcl-2* va ser originàriament identificat al punt de translocació t(14;18) que es dona en limfomes limfoblàstics. Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes són homòlegs al gen antiapoptòtic *ced-9*, identificat en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* com a inhibidor dels gens proapoptòtics *ced-3* i *ced-4*. Ara se sap que el gen *bcl-2* pertany a una família de gens amb uns productes reguladors de l'apoptosi, que poden ser tant antiapoptòtics (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-1, Mcl-1 i A1), com proapoptòtics (Bax, Bak, Bcl-X<sub>s</sub>, Bad, Bid, Bik, Hrk, etc.). Aquestes proteïnes difereixen en el patró d'expressió, que variarà segons el teixit, en el tipus d'activació i en les característiques estructurals (revisat per Kroemer G, 1997 i Adams JM i Cory S, 1998).



## Característiques de la família Bcl-2

El gen *Bcl-2* codifica per una proteïna de 25 kDa. Els 21 aminoàcids situats a l'extrem carboxi determinaran una regió hidròfoba que permetrà a les proteïnes ancorar-se a les membranes. Serà doncs, un domini transmembrana (TM). Tots els membres de la família Bcl-2, excepte Bad i Bid, contenen aquest domini. Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> es troben predominantment a la cara citoplasmàtica de la membrana mitocondrial externa, però també es localitzen a l'envolta nuclear i al reticle endoplasmàtic. La majoria d'homòlegs de Bcl-2 tenen aquest domini carboxi terminal hidròfob, però no tots es troben ancorats a la membrana.

Els membres de la família Bcl-2 es poden definir per la presència de regions conservades que es coneixen amb el nom de dominis d'homologia (de BH1 a BH4), que es trobaran en una quantitat variable. Aquests determinaran la capacitat de les proteïnes d'interactuar entre elles mateixes o amb d'altres (Figura 24) (revisat per Brown R, 1997 i Kroemer G, 1997).

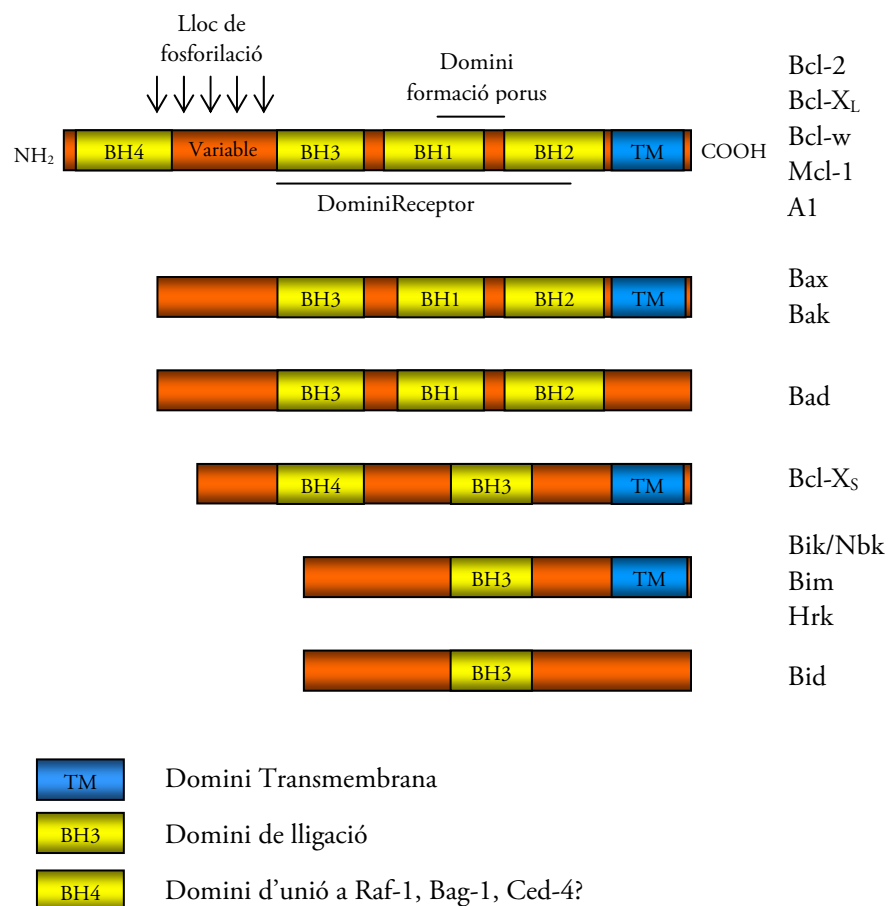


Figura 24. Relació estructura-funció de les proteïnes de la família Bcl-2.

**BH1 i BH2:** A les proteïnes antiapoptòtiques, permeten la heterodimerització amb Bax per reprimir la mort cel·lular per apoptosi.

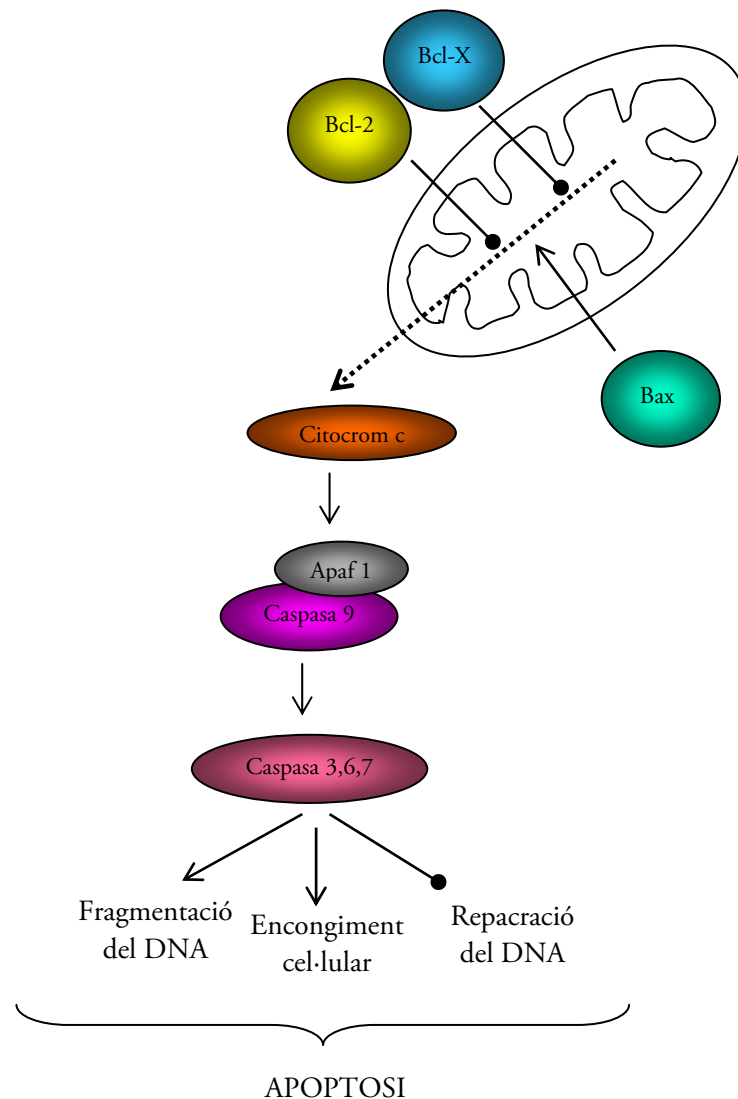
**BH3:** A les proteïnes proapoptòtiques, com Bax i Bak, permet la heterodimerització amb Bcl-X<sub>L</sub> i Bcl-2 per promoure la mort cel·lular per apoptosi.

**BH4:** És conservat a les proteïnes antiapoptòtiques, com Bcl-X<sub>L</sub>, però absent a les proapoptòtiques, excepte Bcl-X<sub>S</sub>. Aquest domini permet la interacció amb proteïnes reguladores de mort cel·lular, com Raf-1, Bad i potser Ced-4 (modificat de Kroemer G, 1997).

## Mecanismes d'acció

En analitzar l'estructura cristal·logràfica d'alguns dels membres de la família Bcl-2, es va veure que eren capaços de formar canals iònics a les membranes. Aquests canals es distribueixen de forma agregada a les zones d'adhesió entre la membrana mitocondrial interna i l'externa, essent importants en l'importació d'ions i de proteïnes. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i Bax poden formar porus transmembrana amb selectivitat iònica. Aquests porus poden explicar la permeabilitat transitòria que es dona a l'apoptosi i la capacitat dels membres de la família Bcl-2 per a regular-la. Una sobreexpressió de Bcl-2 prevé la permeabilitat transitòria degut a que impedeix la formació del porus per part de Bax. D'aquesta manera s'impedeix l'alliberament del citocrom c al citosol durant l'apoptosi. S'ha vist que la mitocondria és un orgànul important en el procés d'apoptosi per diversos motius. En primer lloc, proteïnes com Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> es localitzen a la membrana mitocondrial, i els mutants d'aquestes proteïnes que no s'hi poden ancorar veuen reduïda la seva capacitat antiapoptòtica. Per altra banda, Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> poden unir-se a l'extrem carboxi d'Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*) i transportar-lo a la membrana mitocondrial. Això impedirà que Apaf-1 activi a les caspases, que són les executores de l'apoptosi (Hu Y *et al.*, 1998; Pan G *et al.*, 1998).

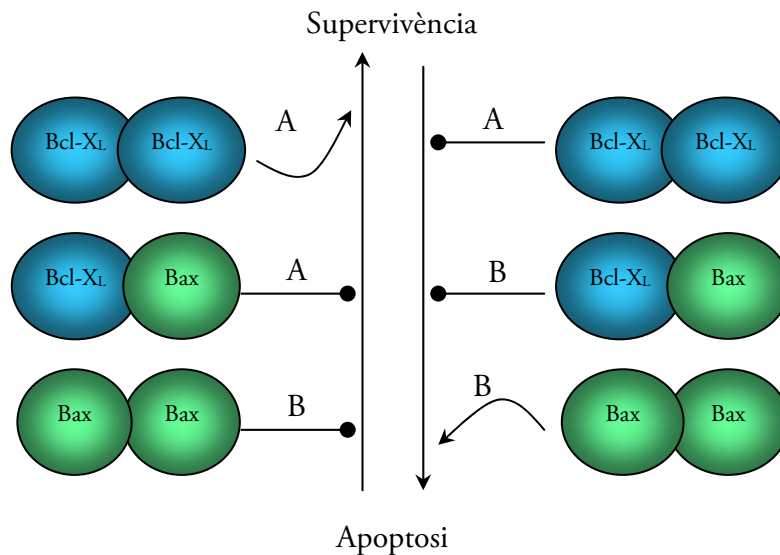
Les proteïnes mitocondrials, quan es difonen al citosol són capaces d'induir la mort cel·lular. Durant l'apoptosi, s'alliberen factors mitocondrials com el citocrom c, l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) i d'altres com l'Apaf-1 i l'Apaf-3, gràcies als canals transmembrana. Aquests factors activaran a les caspases, i per tant tindrà lloc el procés apoptòtic. Nivells elevats de Bcl-2 poden prevenir l'alliberament d'aquestes molècules, mentre que els inhibidors de caspases no poden. Això indica que l'alliberament de citocrom c i AIF és posterior a la funció de Bcl-2, però anterior a la de les caspases (revisat per Zimmermann KC i Green DR, 2001 i Daniel PT, 2000).



**Figura 25.** Mecanisme d'acció apoptòtic. Un senyal de mort cel·lular induirà la translocació dels membres proapoptòtics de la família de Bcl-2 del citosol cap a la mitocòndria. Allà s'alliberarà el citocrom c, que catalitzarà l'oligomerització d'Apaf-1, el qual recluta i activa a la procaspasa 9. Aquesta activarà a les procaspases 3, 6 i 7, comportant finalment l'apoptosi (modificat de Zimmermann KC i Green DR, 2001).

Existeixen diferents mecanismes possibles d'actuació a la família Bcl-2. Les proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> poden bloquejar l'activitat proapoptòtica de Bax i Bad. No està clar però, si actuen formant homodímers amb elles mateixes o heterodímers amb proteïnes proapoptòtiques per tal de bloquejar la mort cel·lular. El que sí és important és que la taxa d'agonistes de mort cel·lular *versus* antagonistes determinarà si una cèl·lula respondrà a un senyal apoptòtic. Aquest reostat mort-vida està mitjançat, almenys en part,

per la competència per la dimerització que es dona entre parells d'agonistes i antagonistes (Oltvai ZN *et al.*, 1993; revisat per Kroemer G, 1997; Zamzami N *et al.*, 1998) (Figura 26). Així doncs, els membres de la família Bcl-2 interactuen entre ells portant a un equilibri dinàmic entre homo- i heterodímers. No se sap però, quins dels dímers són els veritables reguladors de l'apoptosi, podent formar un complex multiproteic. Els diferents membres de la família Bcl-2 tenen diferents mecanismes funcionals que no necessàriament són excloents.



**Figura 26.** La dimerització regula la decisió d'anar o no cap a la mort cel·lular.

**A.** Els homodímers de Bcl-X<sub>L</sub> tindran una acció supressora de la mort cel·lular o promouran la seva supervivència. Per tant, l'heterodimerització de Bcl-X<sub>L</sub>/Bax afavoreix la mort cel·lular.

**B.** Els homodímers de Bax promouran la mort cel·lular o inhibiran la seva supervivència. Així, l'heterodimerització Bcl-X<sub>L</sub>/Bax inhibirà la mort cel·lular.

**C.** Tant A com B regulen la mort de la cèl·lula.

(Modificat de Kroemer G, 1997).

Els membres de la família Bcl-2 estan regulats a nivell transcripcional. Certs gens pro-supervivència són induïts transcripcionalment per certes citocines. En canvi, l'expressió de Bax està controlada per p53. A part dels canvis en els nivells d'expressió dels gens, ens podem trobar canvis posttranslacionals com la fosforilació, que comportaran una regulació de l'activitat de les proteïnes (Chang BS *et al.*, 1997).

### Expressió de Bcl-2 i Bcl-X

La proteïna Bcl-2 té una expressió generalitzada en el sistema nerviós central durant el desenvolupament embrionari, essent més restringida i disminuïda després del naixement. Pel que fa al sistema nerviós perifèric, hi ha un manteniment de l'expressió de Bcl-2 al llarg de la vida, tant a les neurones com a les cèl·lules de suport dels ganglis sensorials (Merry DE *et al.*, 1994). Bcl-2 també s'expressa a teixits de derivació endocrina, a poblacions de cèl·lules mare epitelials, a nefrones proximals del ronyó en desenvolupament i zones d'interacció entre l'epiteli i el mesènquima (LeBrun DP *et al.*, 1993; Yachnis AT *et al.*, 1998).

Bcl-X també presenta una distribució generalitzada per tot el sistema nerviós central, augmentant a la medul·la espinal en el període d'increment de mort cel·lular programada. Al cervell, l'expressió augmenta després del naixement fins arribar a nivells elevats a la vida adulta (Frankowski H *et al.*, 1995; Yachnis AT *et al.*, 1998).

## D. L'AME I L'APOPTOSI

Sarnat HB va ser el primer en suggerir que als individus amb AME hi havia alteracions en el programa de mort neuronal durant el desenvolupament, observant una persistència o reactivació de la mateixa (Sarnat HB, 1983). No va ser fins l'any 1990 que es va descriure l'apoptosi a fibres musculars de pacients amb AME. Van fer un estudi a nivell ultraestructural i van trobar característiques morfològiques típiques d'apoptosi, com ara condensació del nucli i del citoplasma, amb la conseqüent fragmentació en cossos apoptòtics, i final fagocitosi per part dels macròfags (Fidzianska A *et al.*, 1990). Més tard, Tews DS i Goebel HH van analitzar també a múscul de pacients els nivells de fragmentació del DNA i l'expressió de Bcl-2. Observaren una major fragmentació del DNA i uns nivells més baixos de Bcl-2 en comparació amb individus controls, però argumentaven que aquestes diferències es devien al menor grau de maduració de les fibres musculars (Tews DS i Goebel HH, 1996). En estudiar l'expressió de la proteïna proapoptòtica Bax, van veure que hi havien uns alts nivells al teixit muscular de pacients, de manera que van suggerir que

L'apoptosi podia jugar un paper important en la degeneració de les fibres musculars en l'AME (Tews DS i Goebel HH, 1997).

Posteriorment es van realitzar estudis a medul·la espinal de pacients, en les que no es va detectar fragmentació del DNA a les neurones motores de la banya anterior, utilitzant la tècnica de TUNEL. Les que havien entrat en procés de mort tampoc mostraven immunoreactivitat per c-Jun/AP-1, Bcl-2, Bcl-X o Bax (revisat per Ferrer I, 1996; Hayashi M *et al.*, 1998). Aquest estudi es contradiu amb el de Simic G *et al.*, en el que sí troben un nombre significatiu de neurones motores TUNEL positives i amb una ultraestructura típicament apoptòtica. Per altra banda, observen una pèrdua d'expressió de Bcl-2 al citoplasma d'aquestes cèl·lules, de manera que suggereixen que s'afavoreixen les condicions per que es doni lloc la mort de les neurones motores (Simic G *et al.*, 2000).

Estudiant la funció de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 mitjançant la tècnica de doble-híbrid, es va identificar a SMN com a proteïna d'interacció amb Bcl-2. Aquesta interacció es va observar a cèl·lules de mamífer després de transfectar transitòriament cèl·lules COS-7 amb les dues proteïnes, i una posterior immunoprecipitació. Van veure que SMN i Bcl-2 colocalitzaven a una fracció membranosa de les cèl·lules (Iwahashi H *et al.*, 1997). Més tard, el mateix grup va demostrar que, la regió codificada per l'exó 6 de la proteïna SMN i la regió N-terminal de Bcl-2 eren necessàries per a aquesta interacció (Sato K *et al.*, 2000). Pel que fa a l'efecte que SMN té sobre l'activitat de Bcl-2, van observar que la coexpressió de les dues proteïnes augmentava l'efecte antiapoptòtic de Bcl-2. En canvi, la proteïna SMN<sup>Y272C</sup> no exercia cap efecte sinèrgic (Iwahashi H *et al.*, 1997). Contràriament a aquests experiments, Coover D *et al.* no van trobar una interacció directa entre les proteïnes SMN i Bcl-2 natives en cèl·lules T limfoblàstiques humanes (Junkat) en proliferació i en apoptosi, així com tampoc a medul·la espinal i cèl·lules COS-7 transfectades amb SMN i Bcl-2. No exclouen però, la possibilitat que la interacció es doni de manera indirecta durant el procés de mort cel·lular. Postulen que la reducció dels nivells de SMN comporten un *splicing* ineficient que portarà a una reducció o acumulació d'un producte crític que causarà la mort de les neurones motores (Coover D *et al.*, 2000).

Un altre grup però, torna a llançar la idea de que SMN juga un paper dins de l'apoptosi. Kerr DA *et al.* desenvolupen un sistema utilitzant el vector d'expressió SV (*Sindbis virus*), que és capaç d'introduir gens específicament a neurones, tant en cultiu com *in vivo*. Amb aquests experiments, conclouen que la proteïna SMN protegeix a les neurones de l'apoptosi, i en canvi, SMN amb mutacions típiques de pacients amb AME comporten una acceleració de la mort neuronal. Això fa pensar que l'activitat proapoptòtica de les proteïnes SMN mutades porti a la patologia de l'AME (Kerr DA *et al.*, 2000).

Seguint en la mateixa línia, Cisterni C *et al.* van voler determinar si realment SMN jugava un paper directe en la supervivència de les neurones motores, i ho van fer introduint

*Smn* mRNA antisentit, *full-length*, o la forma truncada de SMN dins de neurones motores de rata en cultiu. Vam trobar que, uns nivells elevats de SMN no eren capaços de protegir a les neurones motores de la mort induïda per privació tròfica o excitotoxicitat, de manera que no serà un factor de supervivència *per se* per les neurones motores. D'altra banda, demostren que la sobreexpressió de la forma truncada de SMN comporta una modificació en la localització subcel·lular, i exerceix un efecte de dominància negativa en la biogènesi de les snRNP essent l'*splicing* del RNA a cèl·lules HeLa infecciós (Cisterni *et al.*, 2001).

Recentment, el grup de Vyas S *et al.* han demostrat que la proteïna SMN humana inhibeix la mort cel·lular de cèl·lules PC12 privades de suport tròfic, i a les Rat-1 (fibroblasts de rata) induïdes a la mort per l'activació del proto-oncogen c-Myc. Endarrerix l'inici de l'apoptosi prevenint l'alliberament del citocrom c i l'activació de la caspasa-3, de manera que actuarà a través de la supressió de les vies mitocondrials de l'apoptosi. Aquesta funció de supervivència es perdrà a les cèl·lules PC12 en expressar la proteïna amb deleció de l'exó 7 ( $\Delta 7$ ), del 6 i del 7 ( $\Delta 6/7$ ) o la mutació puntual Y272C. En canvi, a Rat-1 les proteïnes mutades tindran un efecte proapoptòtic. També mostren que l'extrem carboxi de la proteïna SMN, i més concretament els exons 6 i 7, són importants per a la funció d'inhibició de la mort cel·lular (Vyas S *et al.*, 2002).





# Objectius



## **Objectiu general**

En aquesta tesi, s'ha volgut fer un estudi sistemàtic de l'atròfia muscular espinal durant el desenvolupament fetal, per tal d'entendre quina és la progressió de la malaltia en els estadis primerencs, i quins mecanismes intervenen en el desenvolupament de la mateixa. Els canvis anatomopatològics típics descrits en l'AME, com la pèrdua i degeneració de les neurones motores, han estat troballes post mortem, i reflecteixen parcialment el que ocorre en el desenvolupament de la malaltia. A partir del descobriment del gen *SMN* i la possibilitat de realitzar un diagnòstic prenatal, hem pogut detectar fetus amb AME, cosa que ens ha permès estudiar la malaltia com un procés dinàmic i no en un estadi terminal. Tot això, ens podria ajudar a augmentar els coneixements de les bases fisiopatològiques, i el mecanisme de la malaltia, així com trobar possibles solucions terapèutiques que són ara inexistents.

## **Objectius concrets**

Per tal de caracteritzar el desenvolupament de l'AME, s'han delimitat diverses àrees d'estudi, com la mort neuronal, la funció colinèrgica, la implicació del múscul com a teixit afectat per la malaltia i l'expressió del gen *SMN*.

### **Mort neuronal**

- Fer una anàlisi quantitativa i morfològica de les neurones motores de la medul·la espinal comparant fetus control i afectes.
- Determinar en quin moment del desenvolupament apareixen els canvis morfològics degeneratius o la mort cel·lular, detectats en les neurones motores dels pacients amb AME.
- Esbrinar si, la degeneració i pèrdua de les neurones motores de la banya anterior de la medul·la espinal a l'AME són degudes a un increment en la mort cel·lular, a través d'un mecanisme apoptòtic.
- Estudiar el patró d'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> i la proapoptòtica Bax.

### Funció colinèrgica

- Descriure el patró d'expressió de la ChAT durant el desenvolupament humà comparant controls i afectes.
- Esbrinar si les neurones motores dels individus AME tipus I, tant als fetus com als nounats, presenten alteracions en la seva funció colinèrgica.

### Desenvolupament muscular

- Realitzar una descripció comparativa del múscul esquelètic als fetus control i AME.
- Esbrinar si hi ha un augment de la mort cel·lular en aquest teixit als fetus afectes, contribuint per tant en la causa de la degeneració neuronal.
- Estudiar el patró d'expressió de les proteïnes involucrades en la mort cel·lular (Bcl-2, Bcl-X i Bax).

### Expressió de SMN2

- Fer una comparació de l'expressió de SMN entre els fetus control i els AME tipus I a la medul·la espinal, múscul esquelètic i diversos teixits no afectats per la malaltia. Degut a que els fetus afectes tenen deleció homozigota de *SMN1*, l'expressió que s'observi serà dels transcrits i la proteïna codificada per *SMN2*. Això ens permetrà hipotetitzar quin paper juga *SMN2* en el període fetal.


# Resultats



## TREBALL 1

### **Augment i inici de la mort neuronal durant el desenvolupament fetal de la medul·la espinal en l'atròfia muscular espinal tipus I**

### **Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord**

*Brain* 2002; 125:1624-34. 

En l'atròfia muscular espinal es dona degeneració i pèrdua de les neurones motores de la banya anterior de la medul·la espinal, degut a la mutació en el gen *SMN* (*Survival Motor Neuron*). En aquest treball, ens vam fixar com a objectiu esbrinar a través de quin mecanisme i en quin moment es donava la degeneració i pèrdua de les neurones motores. Per fer-ho, es van analitzar tant fetus com individus postnatsals afectats per la malaltia, i es van comparar amb els respectius controls. Es va fer una anàlisi quantitativa del nombre de neurones motores i de la vulnerabilitat del DNA nuclear de les mateixes. Mitjançant la tècnica de TUNEL, es va poder detectar un increment de cèl·lules amb fragmentació del DNA nuclear a fetus AME, entre les 12 i les 15 setmanes de gestació. Això es va veure reflectit amb una disminució del nombre de neurones motores de la banya anterior. Al final del període fetal i durant el postnatal, ja no es detecta aquesta vulnerabilitat del DNA nuclear. El que sí es van observar, van ser canvis morfològics a les neurones motores, però només després del naixement. Així, es va poder concloure que, durant el desenvolupament fetal, la mort neuronal a la banya anterior de la medul·la espinal de fetus AME tipus I es veu incrementada respecte els valors control. L'absència de mort neuronal per apoptosi en el període postnatal i els canvis patològics de la malaltia, indiquen que podria existir un altre mecanisme que afectés a les neurones motores durant aquest període. Es pot hipotetitzar que l'atròfia muscular espinal respon de manera diferent segons l'edat, portant a la mort cel·lular i degeneració de les neurones motores durant el desenvolupament.





## ANNEX DEL TREBALL 1

### Estudi comparatiu de morfologia i mort cel·lular al múscul esquelètic de les extremitats superiors i inferiors de fetus control i AME

#### Introducció

Una de les característiques de l'AME és l'atròfia progressiva dels grups musculars, que vindrà donada per la degeneració i pèrdua de les neurones motores de la banya anterior de la medul·la espinal. S'han realitzat diversos estudis dels canvis morfològics que es produeixen al múscul esquelètic dels pacients amb AME, però hi ha molt poca informació sobre les característiques d'aquest teixit en el període fetal (Hausmanowa-Petrusewicz I *et al.*, 1980; Fidzanska-Dolot A i Hausmanowa-Petrusewicz I, 1984). Per altra banda, hi ha varis treballs que mostren apoptosi a les fibres musculars de pacients amb AME (Fidzianska A, 1990; Tews DS i Goebel HH, 1997) i d'altres que suggereixen una mort per necrosi (de Torres C *et al.*, 2000). Així doncs, varem fer una comparació morfològica del múscul esquelètic de fetus control i AME mitjançant microscòpia òptica, per fer una posterior anàlisi de la mort de les fibres musculars per la tècnica de TUNEL.

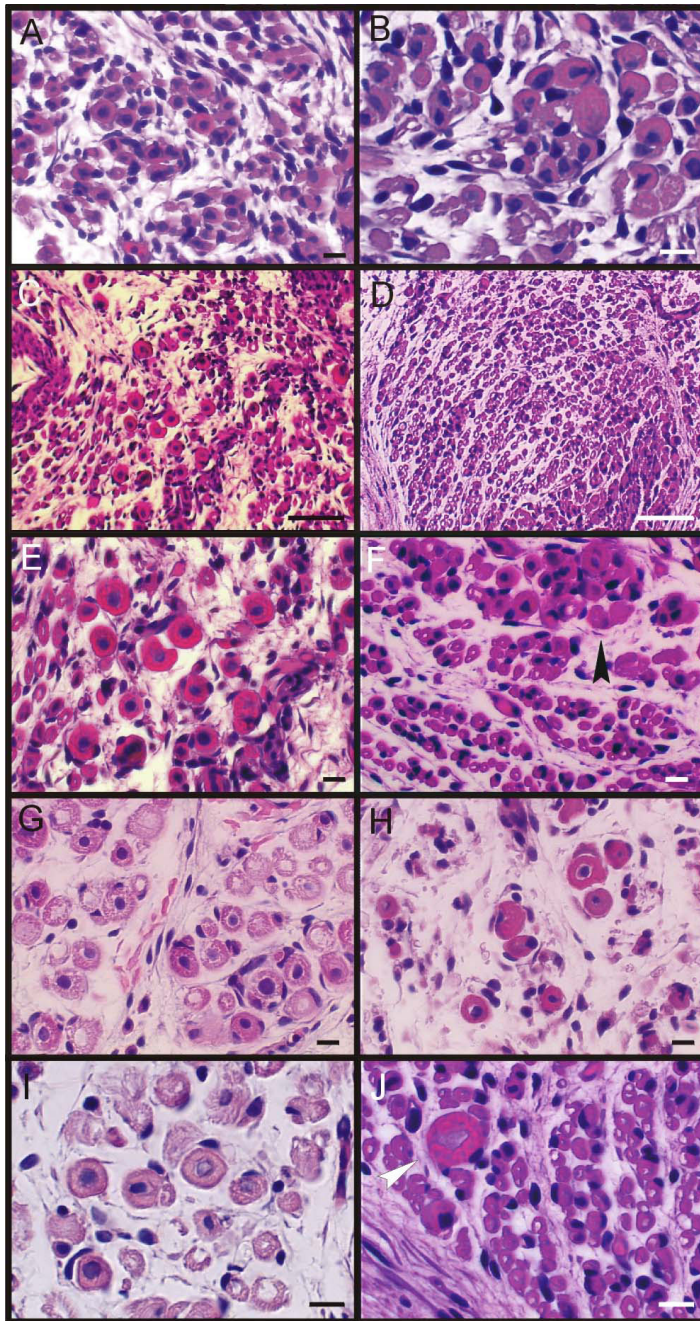
#### Material i mètodes

Es van analitzar 7 fetus control de 10 (2), 12 (3) i 15 (2) setmanes de gestació i es van comparar amb 4 fetus amb AME tipus I de 12 (2) i 15 (2) setmanes, als que se'ls havia confirmat la deleció homozigota dels exons 7 i 8 del gen *SMN*. Es van recol·lectar les extremitats superiors i inferiors de cada un dels fetus, i immediatament es van fixar en paraformaldehid al 4% per la posterior inclusió en parafina. Es van realitzar talls de 5 µm i es van col·locar en portaobjectes tractats amb L-lisina al 50%. Per l'anàlisi de la morfologia, es va fer una tinció d'hematoxilina-eosina, i per la detecció de la mort de les fibres musculars, es va utilitzar un kit de detecció d'apoptosi *in situ* basat en la tècnica de TUNEL (ApopTag peroxidase kit, Intergen) (explicat anteriorment a Soler-Botija C *et al.*, 2002). Els resultats van ser analitzats amb un microscopi òptic Nikon ES-400 a diferents augments.

#### Resultats

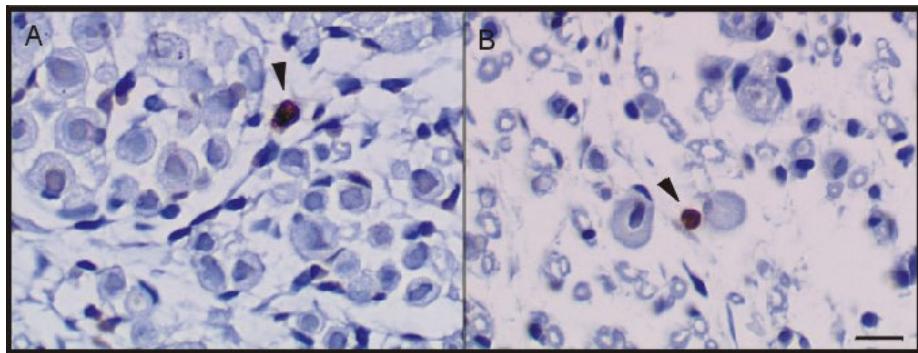
En comparar tant les extremitats superiors com inferiors dels fetus control amb els AME, vam observar diferències en el desenvolupament dels mio blasts i miotubs. Als fetus amb AME, aquests aparentaven ser menys diferenciats, observant-se un major nombre de

mioblasts i miotubs de mida inferior a la trobada als fetus control. Per altra banda, cal destacar la presència als fetus AME de miotubs de mida comparable a la dels control, però amb una distribució més irregular, presentant-se en petites agrupacions i no uniformement com en els fetus sans (Figura 1).



**Figura 1.** Talls transversals d'extremitats fetals a diferents etapes del desenvolupament. Control (A, B, C, E, G, I) i AME (D, F, H, J) de 10 (A, B), 12 (C-F) i 15 (G-J) setmanes de gestació. Vegeu la tendència dels miotubs a distribuir-se uniformement en el teixit sa. En canvi, s'observa una agrupació dels miotubs al teixit AME, amb zones de miotubs de mida normal amb altres de mida més reduïda. A la imatge F la fletxa indica una agrupació de miotubs i a la J un miotub aïllat. Tinció d'hematoxilina-eosina. Escala: 10 µm (A, B, E-J); 50 µm (C, D).

L'anàlisi de la mort cel·lular mitjançant la tècnica de TUNEL no ens va mostrar diferències entre els fetus control i els AME. A la medul·la espinal teníem la limitació de la banya anterior pel recompte de cèl·lules TUNEL positives i de morfologia apoptòtica. En canvi, degut a les característiques morfològiques del teixit muscular, no va ser possible determinar una àrea als músculs examinats, per tal de fer el recompte del nombre de cèl·lules apoptòtiques. Tot i això, vam poder fer una valoració qualitativa de les mostres als camps observats al microscopi, als quals no vàrem trobar diferències aparents. En ambdós grups vam analitzar diferents seccions de regions similars, tant proximals com distals de membres superiors i inferiors. Vam observar cèl·lules apoptòtiques aïllades, aparentment necessàries per la correcta formació del teixit, però a aquest nivell d'observació, no ens va ser possible detectar cap diferència numèrica (Figura 2).



**Figura 2.** Cèl·lules TUNEL positives amb morfologia apoptòtica al teixit muscular esquelètic. Tall transversal d'extremitat d'un fetus control de 10 setmanes de gestació (A) i d'un fetus AME de 12 setmanes (B). Les fletxes indiquen les cèl·lules apoptòtiques. Escala: 10  $\mu$ m.



## TREBALL 2

### **Regulació descendent de les proteïnes Bcl-2 a les neurones motores AME tipus I durant el desenvolupament fetal**

### **Down-regulation of Bcl-2 proteins in type I SMA motor neurons during fetal development**

*Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2003; 62:420-6

En el treball anterior, es va mostrar un augment significatiu de neurones motores amb fragmentació del DNA a fetus amb atròfia muscular espinal tipus I. Això va suggerir que el procés de mort cel·lular programada estava incrementat en el desenvolupament fetal. És per això que ens vam plantejar aprofundir en aquesta línia i estudiar dues proteïnes antiapoptòtiques, com són Bcl-2 i Bcl-X. Es va fer una anàlisi per Western blot i immunohistoquímica de mostres fetals tant control com AME. Es van detectar ambdues proteïnes a diferents estructures i poblacions neuronals de la medul·la espinal. A les 12 setmanes, l'expressió de Bcl-2 i Bcl-X a les neurones motores d'individus AME era similar a la dels controls, essent aquesta elevada. En canvi, a les 15 setmanes, el comportament variava. Bcl-2 disminuïa la seva expressió a les neurones motores AME, quan als control encara persistia. Pel que fa a Bcl-X, s'observava un retard en la seva aparició respecte als controls, afectant la compensació de la disminució fisiològica que pateix Bcl-2 de manera natural. Podem hipotetitzar que les diferències tant en el grau com en el patró d'expressió d'aquestes dues proteïnes, faran a les neurones motores més susceptibles a la mort cel·lular programada que es dona durant el desenvolupament. Contràriament, es pot pensar que és l'afectació neuronal, causada per els baixos nivells de SMN, la que comportaria una alteració en l'actuació de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-X.



## Downregulation of Bcl-2 Proteins in Type I Spinal Muscular Atrophy Motor Neurons During Fetal Development

CAROLINA SOLER-BOTIJA, BSc, ISIDRO FERRER, MD, PhD, JOSE LUIS ALVAREZ, BSc, MONTSERRAT BAIGET, PhD,  
AND EDUARDO F. TIZZANO, MD, PhD

**Abstract.** Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the survival motor neuron gene. The degeneration and loss of the anterior horn cells constitute the major neuropathological finding in SMA, although the mechanism and timing of this abnormal motor neuron death remain unknown. It has recently been reported that the fetal SMA spinal cord shows a significant increase in cells with DNA fragmentation, suggesting that the programmed cell death is aberrantly increased in type I SMA during development. We have analyzed 2 antiapoptotic proteins, Bcl-2 and Bcl-X, by Western blot and immunohistochemistry screening for differential expression in control and SMA fetal spinal cords. Expression of these proteins was found in various neuronal populations and structures of the developing spinal cord. At 15 weeks, motor neurons of SMA fetuses showed a marked decrease in the levels of Bcl-2 and a delay in the expression of Bcl-X in comparison with controls. The difference in the pattern and degree of expression is consistent with a role for both proteins in the aberrant programmed cell death observed in type I SMA.

**Key Words:** Apoptosis; Bcl-2; Bcl-X; Human development; Motor neuron death; SMN1; Spinal muscular atrophy.

### INTRODUCTION

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder characterized by degeneration and loss of motor neurons of the spinal cord, resulting in progressive muscular paralysis with skeletal muscular atrophy. This disease can be divided into 3 groups according to clinical criteria. Type I (Werdnig-Hoffmann disease) is the most severe, with onset occurring before 6 months and death by 2 years. Type II is the intermediate form, with onset before the age of 18 months and with patients never gaining the ability to walk. Type III (Kugelberg-Welander disease) is a milder form, with onset after the age of 18 months and ambulation preserved.

The survival motor neuron (SMN) gene, which when mutated causes SMA (1), is expressed in the motor neurons of the spinal cord as well as in various neuronal populations (2). In vitro studies have demonstrated an interaction between the SMN protein and various components of the spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs), forming a complex (3, 4). Although SMN plays a crucial role in the biogenesis of mRNA (an essential function for all cells), the reason for the almost exclusive involvement of motor neurons in SMA is still unknown.

In the central nervous system, as in other tissues, more cells are produced than are ultimately required by the organism, and the surplus cells subsequently die by means of programmed cell death at specific times during development (5). In SMA there is a supraphysiological loss of the anterior horn motor neurons, although the mechanism of this pathological cell death is not known. It has been suggested that in this disease the neuronal cell death program is affected, leading to a pathological persistence or reactivation of normally occurring apoptosis (6). Considerable evidence suggests that apoptosis is a mechanism of motor neuron death in SMA. Experimental results showing a protective antiapoptotic effect on rat neurons conferred by full-length SMN and also demonstrating that mutant SMN derivatives (e.g. SMN $\Delta$ 7 or Y272C) accelerate neuronal death have recently been reported (7). Apoptosis has also been detected in motor neurons of postnatal Werdnig-Hoffmann disease (8), although this may reflect the end stage of the disease. To gain insight into the active mechanism of disease we focused on developmental studies. We found a significant increase in the number of TUNEL-positive cells in the anterior horn of SMA type I fetuses, suggesting an apoptotic mechanism consistent with increased naturally occurring programmed cell death (9). Recently, similar results have been reported elsewhere, reinforcing the evidence of aberrant fetal apoptosis in SMA (10).

The Bcl-2 family of proto-oncogenes encodes proteins that regulate programmed cell death in several physiological and pathological conditions (11, 12). Bcl-2 regulates cell death and survival during the development of the nervous system (13). Bcl-X is a member of this family and may play a role in brain development since “knockout” mice for this gene suffer massive apoptosis of immature cortical and spinal neurons (14).

---

From Servei de Genètica and Institut de Recerca (CS-B, MB, EFT), and Servei d'Anatomia Patològica (JLA), Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain; Institut de Neuropatologia (IF), Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Bellvitge, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Correspondence to: Eduardo F. Tizzano, MD, PhD, Genetics and Research Institute, Hospital of Sant Pau, Av. Padre Claret 167, 08025, Barcelona, Spain. E-mail: etizzano@hsp.santpau.es

This work was financially supported by Telemarató TV3 Malalties Hereditàries 98-810, EUQLG006 and by Fondo de Investigación Sanitaria grants 98-556, 99-1118, 00-0481, and 02-1275.



In the present study we examined the expression of Bcl-2 and Bcl-X in control and SMA spinal cord sections at different fetal developmental stages in order to determine a possible involvement of these proteins in the cell death process in SMA.

## MATERIALS AND METHODS

### Fetal Specimens

The Ethical Committee of the Hospital Sant Pau and Research Institute approved the project and family consent was obtained for each case. Control fetal material from first and second trimesters of gestation was obtained from elective terminations of pregnancy. Gestational age was determined by ultrasound measurements. Seventeen fetuses with optimal tissue preservation were considered in the present study. Nine controls: 12 weeks ( $n = 4$ ), 15 weeks ( $n = 4$ ), and 22 weeks ( $n = 1$ ) and 8 type I SMA specimens: 12 weeks ( $n = 4$ ), 15 weeks ( $n = 3$ ), and 22 weeks ( $n = 1$ ) were processed for this study. SMA fetuses were obtained from abortions after confirmation of homozygous deletion of exon 7 and 8 of the SMN gene by chorionic villi DNA analysis (15). Six of these SMA cases (12 weeks = 2; 15 weeks = 3; 22 weeks = 1) had homozygous deletion of exon 5 of the neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), localized also in the SMA locus (16). Thoracic and lumbar regions of each spinal cord were assigned according to their location in the macroscopic anatomic identification (i.e. presence of ribs) and immediately fixed by immersion with 4% paraformaldehyde, and then embedded in paraffin. Five- $\mu$ m-thick sections were mounted onto L-Lysine 50%-treated slides and stained with hematoxylin and eosin for morphologic analysis or processed for immunohistochemistry.

### Morphologic Changes in Apoptotic Cells

Apoptosis involves a progressive contraction of cell volume and widespread chromatin condensation but with the initial preservation of the integrity of cytoplasmic organelles. Cells undergoing apoptosis separate into membrane-bound fragments that are rapidly phagocytosed by adjacent cells. In keeping with a study by Clarke (17), we considered apoptotic cells as those with a pyknotic nucleus and a visible clump of nucleolar material and a large soma with substantial cytoplasm. Cells showing condensation of nuclear chromatin, broken spherical profiles apparently engulfed by phagocytes, and rounded masses were also considered.

### Immunoblot

Spinal cords from 1 control (15 weeks) and 1 type I SMA fetus (15 weeks) were available and were processed. Samples were homogenized in Nicholson treatment buffer (125 mM TrisHCl, pH 6.8; 4% SDS; 4M urea; 5% mercaptoethanol; 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) (18) and then boiled for 5 min. The extracts were separated by SDS-PAGE using a mini-protein system (Bio-Rad, Madrid, Spain) with low range molecular weight standards (Bio-Rad). Protein analyzed on gel electrophoresis was electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membranes were then washed with TRIS-buffered solution pH 7.4

and 0.1% Tween-20 (TTBS), and blocked with TTBS containing 5% skimmed milk and 1% BSA for 60 min. The membranes were incubated overnight at 4°C with the polyclonal Bcl-2 antibody at a dilution of 1:150. After washing, the immunoblots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:2,000 dilution; DAKO, Barcelona, Spain) for 1 hour (h) at room temperature, washed again, and developed with the SuperSignal Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford IL). Stripping of the membrane and subsequent reprobing with a rabbit polyclonal antibody Bcl-X<sub>L</sub>, the predominant isoform of the Bcl-X gene (Transduction Laboratories, Lexington, KY) at a dilution of 1:5,000 was performed. A final stripping and subsequent reprobing with a monoclonal actin antibody was performed. Preincubation of the Bcl-2 antibody with available peptide was used to test the specificity of the antibody (see below).

### Densitometric Analyses

Western blot densitometric analyses were performed by scanning and analyzing the Bcl-2, Bcl-X and  $\beta$ -actin band intensities using the imaging analyser Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD) to calculate their ratios.

### Immunohistochemical Procedures

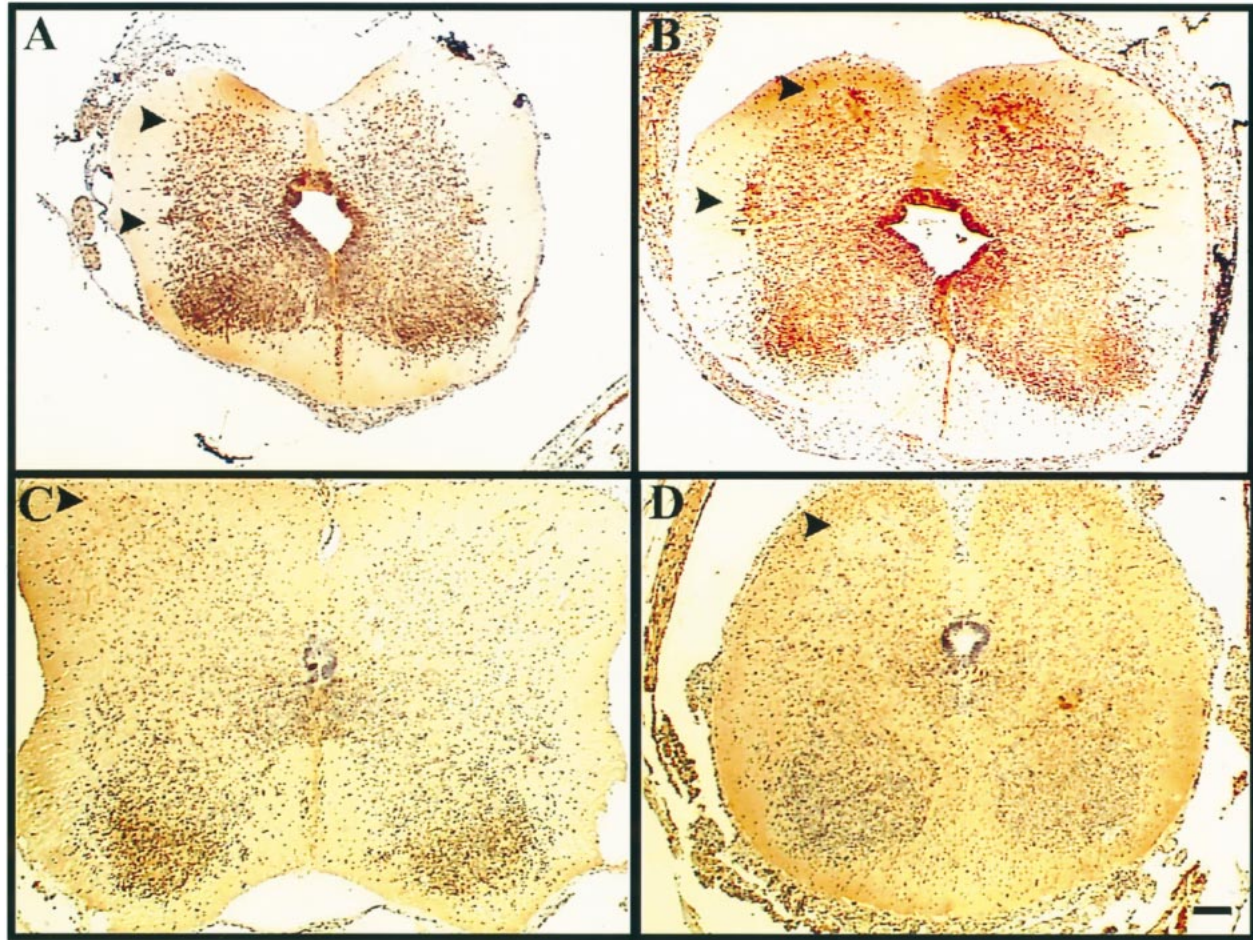
Dewaxed sections were processed for immunohistochemistry following the avidin-biotin-peroxidase method (ABC kit, Vectastain, Vector, Burlingame, CA). After blocking endogenous peroxidase with hydrogen peroxide and methanol, the sections were treated with sodium citrate buffer 10 mM pH6 for 25 min at 100°C and left overnight. The sections were then incubated with normal serum for 2 h at room temperature (1:5 dilution). They were next incubated at 4°C overnight with a rabbit polyclonal antibody Bcl-2 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at a dilution of 1:75, and with a rabbit polyclonal antibody Bcl-X<sub>L</sub> (Transduction Laboratories) at a dilution of 1:500.

Bcl-2 antibody (N-19) was raised against a peptide mapping at the amino terminus of Bcl-2 of human origin whereas Bcl-X<sub>L</sub> was directed to the central region of the protein. As negative reaction controls, the anti-Bcl-2 antibody (dilution 1:75) was preincubated with an excess of Bcl-2 peptide (dilution 1:7.5) for 1 h at room temperature and the sections were incubated with the preadsorbed antibody. The peptide of the Bcl-X<sub>L</sub> antibody from Transduction Laboratories was not available and sections were incubated with the blocking solution for the negative control (data not shown). After the incubation, the sections were exposed to the biotinylated secondary antibody for 15 min, and finally to streptavidin-peroxidase for 15 min at room temperature (HRP Rabbit/Mouse/Goat Universal LSAB<sup>®</sup>+kit, DAKO). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine (Sigma) and 0.01% hydrogen peroxide. The sections were slightly counterstained with hematoxylin.

### Interpretation of the Results

The Bcl-2 and Bcl-X immunoreactivity was compared in each of the gestational stages in control and SMA individuals. Positive immunostaining was considered and quantified visually, comparing the positive zones with the negative control





**Fig. 1.** Global immunostaining pattern of Bcl-2 in fetal spinal cord. Twelve-weeks gestational age control (A) and SMA (B) samples immunostained with the Bcl-2 antibody. The expression is seen in the median and lateral anterior horn motor neuron cluster (arrowheads), the postmigratory young neurons of the posterior horn, the neuroepithelial cells of the central canal, and the posterior septum. No differences were noted between controls and SMA samples. Control (C) and SMA (D) 15-weeks gestational age samples. Note the loss of expression in SMA anterior horn compared with controls (arrowheads). Expression is also decreased in the posterior horn. Scale bar = 100  $\mu$ m.

zones of the same section. The presence of Bcl-2 and Bcl-X differential immunostaining was also studied in apoptotic cells.

## RESULTS

### Bcl-2 Expression

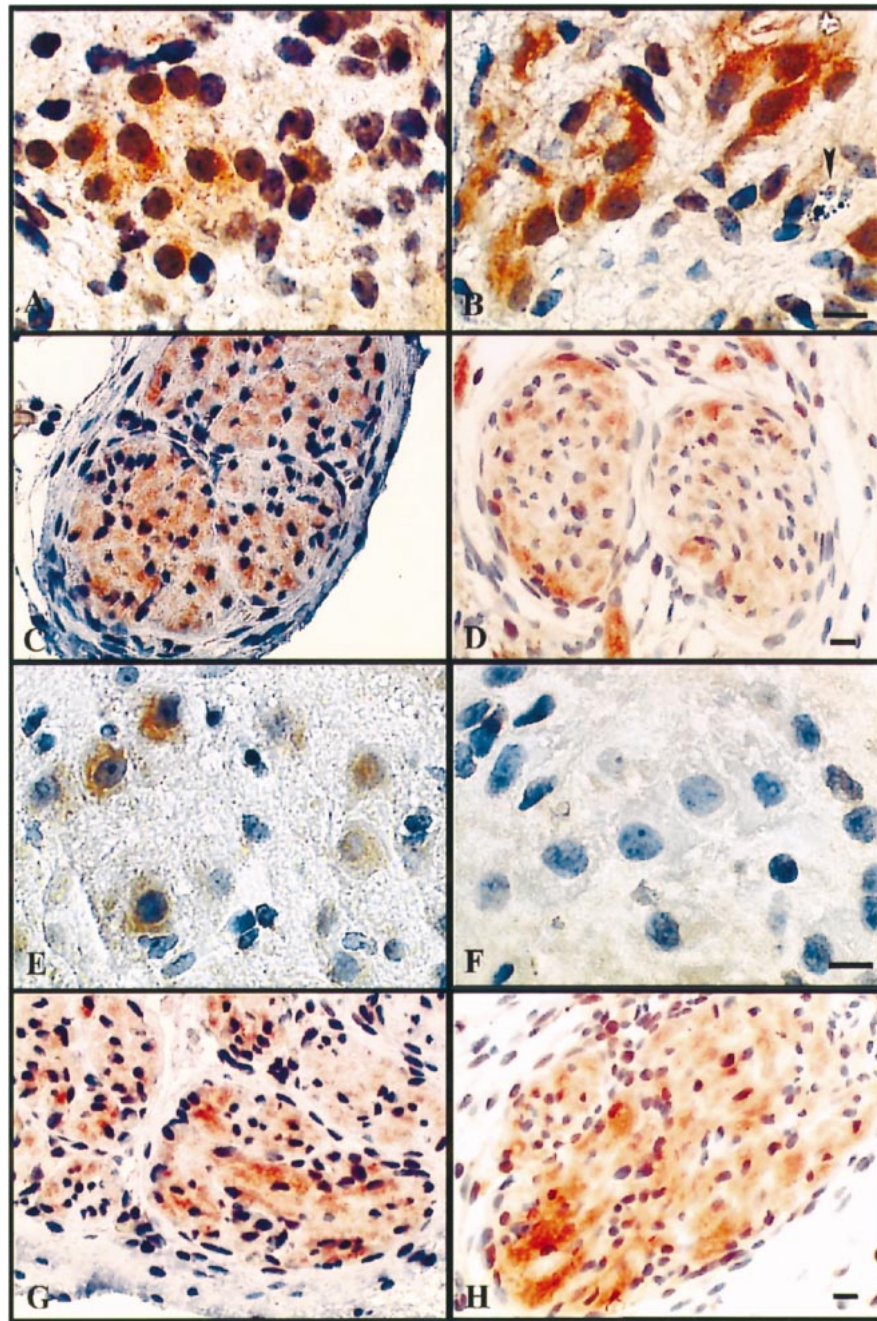
Bcl-2 expression at 12-weeks gestational age was detected in all the samples analyzed. In the spinal cord, practically all neuronal types showed a positive cytoplasmic immunostaining. Specific cells that showed a more intense reactivity included the median and lateral anterior horn motor neuron cluster, the postmigratory young neurons of the posterior horn, the neuroepithelial cells of the central canal, and the posterior septum. Strong expression was also seen in the axons located in the dorsal root ganglia and the peripheral nerve. No differences were noted between control and SMA samples (Figs. 1, 2). At

15 weeks, whereas positive immunostaining was still detected in the control samples (although to a lesser degree), a marked decrease was seen in anterior horn motor neurons of SMA fetuses (Figs. 1, 2). Expression was detected in the other spinal cord structures and in the dorsal root ganglia and peripheral nerves (Fig. 2). A 22-week SMA sample demonstrated a similar pattern (data not shown). The difference in the amount of Bcl-2 observed by immunohistochemistry in 15-week control and SMA samples was confirmed by Western blot analysis, which showed a 28 kDa Bcl-2 band with an approximately 55% decrease in SMA (Fig. 3).

### Bcl-X Expression

At 12-weeks gestational age we found a weak expression of Bcl-X, particularly in motor neurons and the posterior horn neurons, without differences between control

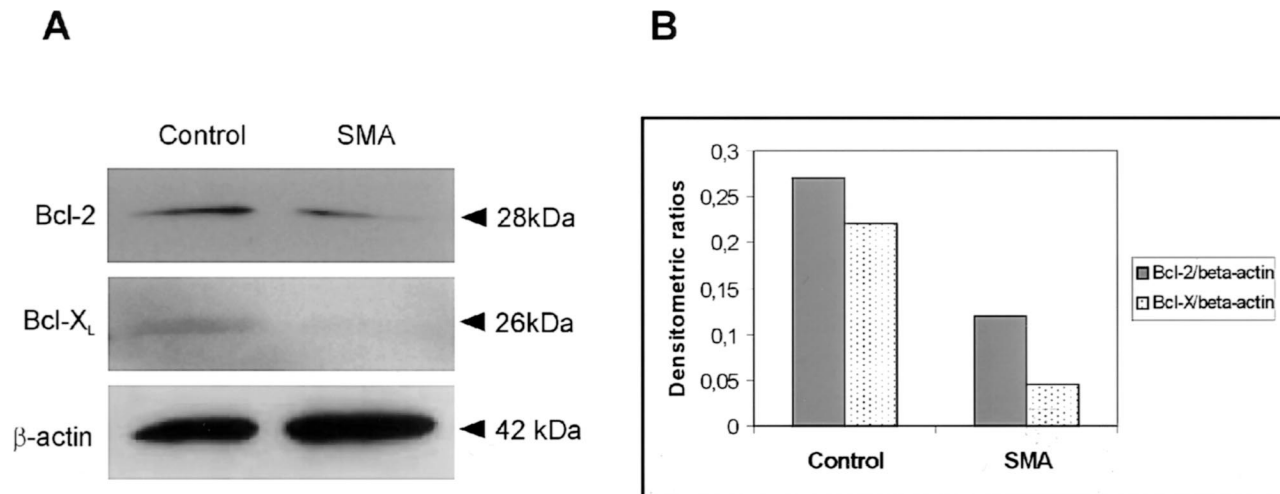




**Fig. 2.** Detailed immunostaining pattern of Bcl-2 in fetal spinal cord. Panels **A–D**: Twelve-weeks gestational age. Control (**A**) and SMA (**B**) motor neurons of the anterior horn. Control (**C**) and SMA (**D**) of peripheral nerve structures. No differences are detected at this stage. The arrowheads in (**A**) and (**B**) indicates apoptotic cells. Panels **E–H**: Fifteen-weeks gestational age. Control (**E**) and SMA (**F**) motor neurons of the anterior horn. Note the marked absence of positive immunostaining in SMA motor neurons. Control (**G**) and SMA (**H**) of peripheral nerve structures. Scale bar = 10  $\mu$ m.

and SMA. The expression was stronger in the central canal and in the 2 septa as well as in dorsal root ganglia and peripheral nerves (Fig. 4). At 15 weeks, a strong immunoreactivity was observed in motor neurons of control fetuses together with a positive expression in the other structures. However, this was not the case in the SMA specimens, where a proportion of motor neurons and

neurons of the posterior horn did not show expression (Fig. 4). At 22 weeks, we still found several neurons without staining or with a weak staining in a SMA specimen. Thus, the increasing expression of Bcl-X during the fetal development seems to be irregular and delayed in type I SMA. The difference in the amount of Bcl-X observed by immunohistochemistry in 15-week control



**Fig. 3.** **A:** Immunoblot showing the Bcl-2 and Bcl-X expression at 15 weeks. Note the significant reduction in the positive signal in the SMA sample. **B:** Histogram showing the Bcl-2/ $\beta$ -actin ratio and the Bcl-X/ $\beta$ -actin of control and SMA. Control ratio was 0.27 and SMA 0.12 (Bcl-2) and 0.22 and SMA 0.045 (Bcl-X).

and SMA samples was confirmed by Western blot analysis, which showed a 26 kDa band with an approximately 75% decrease in SMA (Fig. 3).

We were unable to detect a differential immunoreactive pattern of the 2 proteins in the apoptotic cells identified by morphology (Figs. 2, 4). The pattern was similar in all of the apoptotic morphological phases from control and SMA samples.

The possibility of antibody cross-reaction between the Bcl-2 and Bcl-X antibodies employed in this study was virtually excluded by the discovery of a consistent differential temporal and spatial pattern of cellular expression between the 2 antibodies.

## DISCUSSION

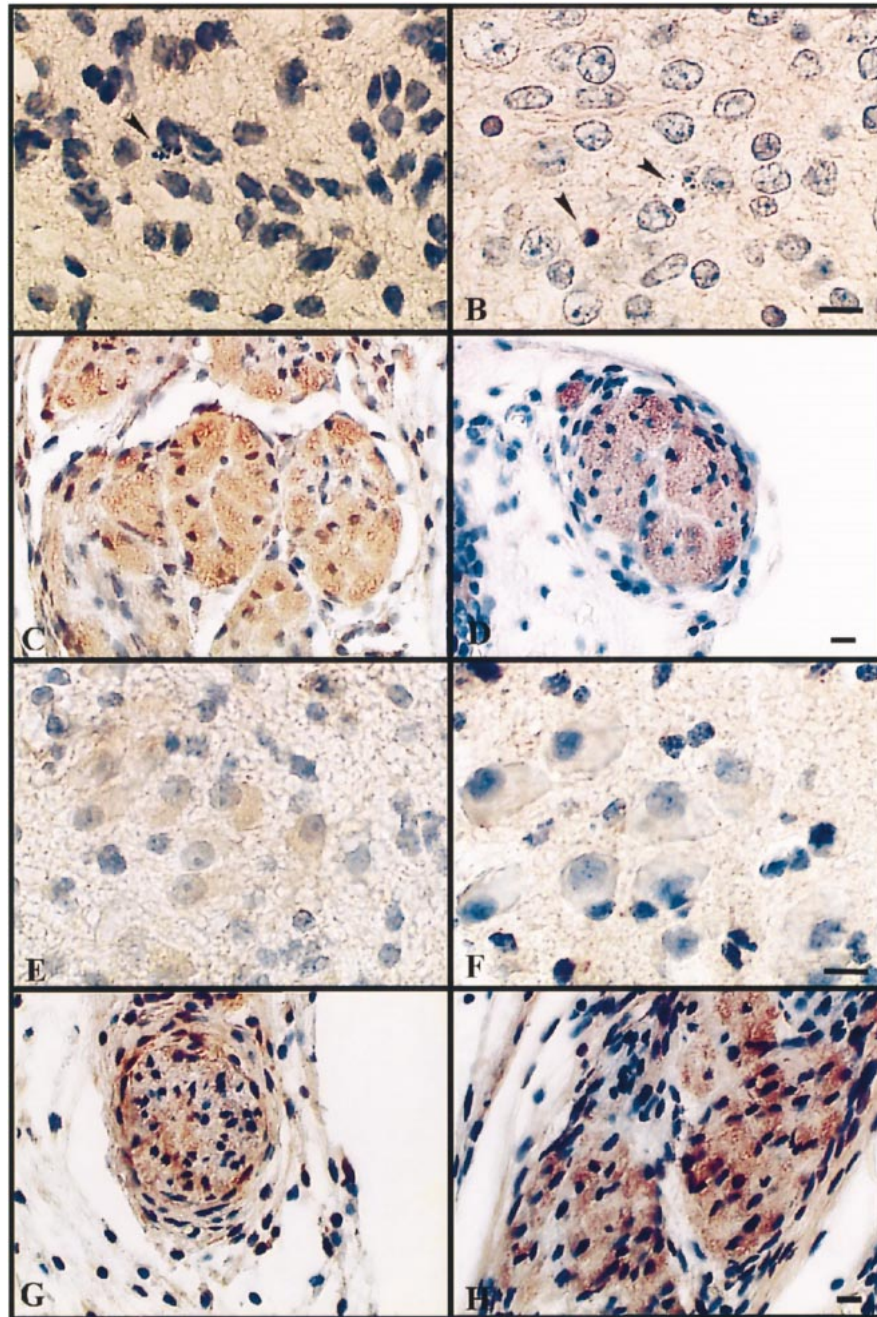
In this work we describe the pattern of Bcl-2 and Bcl-X expression by immunohistochemistry in control and SMA fetuses at 12- and 15-weeks gestational age. In control fetuses, Bcl-2 expression is predominant in motor neurons at 12 weeks, but somewhat reduced at 15 weeks. Little or no Bcl-X expression was detected in motor neurons at 12 weeks, with an increase at 15 weeks. Similar results have been reported in fetuses of from 10- to 20-weeks gestational age (19, 20). This period coincides with an increase in physiological motor neuron death and with the establishment of functional neuromuscular synapses (21). Bcl-2 and Bcl-X may both be required for the survival of early postmitotic neurons before appropriate synaptic connections are established. After Bcl-2 is downregulated, Bcl-X expression may be necessary to continued neuronal survival (22), in addition to its role in target-derived neurotrophic factors. We found that the physiological reduction of Bcl-2 observed in control mo-

tor neurons at around 15 weeks appeared earlier and to a greater degree in SMA motor neurons. Moreover, Bcl-X, which appears to compensate for the Bcl-2 reduction at this stage, showed a patchy and delayed pattern of expression in most of the SMA motor neurons.

The downregulation of Bcl-2 and the irregular expression of Bcl-X in motor neurons may contribute to the increased neuronal death described during the development of SMA fetuses (9, 10). Thus, these results reflect an insufficient Bcl-2 and Bcl-X protection during this period. Bcl-X is weakly expressed at more advanced gestational ages in SMA, which may explain why the enhanced cell death described at 12 to 15 weeks is no longer detected in SMA at advanced fetal stages (9). In agreement with our observations in fetal specimens, Simic et al described reduced Bcl-2 levels in motor neurons of the spinal cord from postnatal SMA type I cases (8). They suggested that the loss of cytoplasmic Bcl-2 expression in patients with SMA favors apoptotic motor neuron death in type I SMA. Interestingly, the three 15-week SMA samples in our study had homozygous absence of NAIP. Although SMA may be attributed exclusively to the loss of SMN function, it is possible that enhanced apoptosis due to the lack of NAIP may exacerbate the disease process. The NAIP gene was initially considered a possible phenotypic modifier gene (16) but its influence on the SMA phenotype has not yet been demonstrated. Further studies on SMA samples with the presence of at least 1 copy of NAIP could be instructive.

An interaction between SMN and Bcl-2 was reported by Iwahashi et al (23). These authors found that the co-expression of SMN with Bcl-2 produced a synergistic preventive effect on Bax-induced apoptosis, a pro-apoptotic factor that sequesters or binds Bcl-2. SMN and





**Fig. 4.** Detailed immunostaining pattern of Bcl-X in fetal spinal cord. Panels **A–D**: Twelve-weeks gestational age. Control (**A**) and SMA (**B**) motor neurons of the anterior horn. Control (**C**) and SMA (**D**) of peripheral nerve structures. The expression is not seen in motor neurons, whereas it is present in peripheral nerve structures without significant differences between control and SMA samples. The arrowheads in (**B**) indicate apoptotic cells. Panels **E–H**: Fifteen-weeks gestational age. Control (**E**) and SMA (**F**) motor neurons of the anterior horn. The expression is detected in control motor neurons whereas it is irregular or absent in most of the SMA motor neurons. Control (**G**) and SMA (**H**) of peripheral nerve structures. Scale bar = 10  $\mu$ m.

Bcl-2 proteins appear to bind with each other in regions that are essential to their function (24). However, other investigators have failed to demonstrate this interaction (25). The neuronal degeneration in SMA patients is mainly restricted to anterior horn motor neurons. Our results show that in SMA tissues, other cell types and fibers in

the spinal cord, dorsal root ganglia, and peripheral nerves are capable of maintaining the expression of Bcl-2 longer, in agreement with the findings of other authors (13, 20). Moreover, Iwahashi et al postulated that SMN might be crucial only in cells with a decreased Bcl-2 expression, such as motor neurons (23). Motor neurons capable of

expressing Bcl-X may prolong their survival by extending anti-apoptotic activity without SMN. However, it is not possible at this stage to rule out other protective factors that might play a role in this process. It has been suggested that the control of cell death may vary with lineage and stage of development owing to the existence of neurons expressing differing subsets of Bcl-2 family members (26). Moreover, the relative expression level of Bcl-2-related death agonist and antagonist is not the sole parameter for determining susceptibility to apoptosis. Thus, posttranslational modification of Bcl-2-related proteins also has a major impact on apoptosis regulation (27). In this context, the mutated form of the SMN protein may alter the interaction between Bcl-2 and SMN, and thus interfere in its synergistic antiapoptotic activity (23).

These results yield interesting insights into the pathogenesis and mechanism of the disease in SMA and warrant further investigation into the cell death pathway during SMA development. The identification of additional protectors or enhancers of apoptosis could play a key role in the search for an early therapy for this disease.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Teresa Folip, Íñigo Espinosa, Jordi Guibernau, Marta Pla, Mónica Vila, Carmen Rodríguez, Juan Parra and María Amenedo for assistance in obtaining and preparing human fetal material. We wish to thank Rosa Blanco, Rosa Rivera, Margarita Carmona, Berta Puig, Isabel Domínguez, Marta Barrachina and Isolda Casanova for technical help.

## REFERENCES

1. Lefebvre S, Bürglen L, Beboutlet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155–65
2. Tizzano EF, Cabot C, Baiget M. Cell-specific SMN gene expression during human development of the central nervous system: Implications for the pathogenesis of SMA. *Am J Pathol* 1998;153:355–61
3. Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 1997;90:1023–29
4. Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 1998;95:615–24
5. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:453–501
6. Sarnat HB. Histopathology of SMA. In: Gamstorp I, Sarnat HB, eds. *Progressive spinal atrophy*. New York: Raven Press, 1983
7. Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM. Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13312–17
8. Simic G, Seso-Simic D, Lucassen PL, et al. Ultrastructural analysis and TUNEL demonstrate motor neuron apoptosis in Werdnig-Hoffmann disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:398–407
9. Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, Baiget M, Tizzano EF. Neuronal death is enhanced and begins during fetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 2002;125:1624–34
10. Fidzianska A, Rafalowska J. Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol* 2002;104:363–68
11. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:4–6
12. Greenlund LSJ, Korsmeyer SJ, Johnson EM, Jr. Role of bcl-2 in the survival and function of developing and mature neurons. *Neuron* 1995;15:639–41
13. Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1997;20:245–67
14. Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995;267:1506–10
15. van der Steege G, Grootsholen PM, van der Vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995;345:985–86
16. Roy N, Mahadevan MS, Mclean M, et al. The gene for neural apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995;80:167–78
17. Clarke PGH. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 1990;181:195–213
18. Nicholson LVB, Davison K, Falkous G, et al. Dystrophin in skeletal muscle. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci* 1989;94:125–36
19. LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993;142:743–53
20. Yachnis AT, Giovanini MA, Eskin TA, Reier PJ, Anderson DK. Developmental patterns of Bcl-2 and Bcl-X polypeptide expression in the human spinal cord. *Exp Neurol* 1998;150:82–97
21. Forger NG, Breedlove SM. Motoneuronal death during human fetal development. *J Comp Neurol* 1987;264:118–22
22. Frankowski H, Misotten M, Fernandez P-A, et al. Function and expression of the *Bcl-x* gene in the developing and adult nervous system. *Neuro Report* 1995;6:1917–21
23. Iwahashi H, Eguchi Y, Yasuhara N, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Tsujimoto Y. Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature* 1997;390:413–17
24. Sato K, Eguchi Y, Kodama TS, Tsujimoto Y. Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product. *Cell Death Differ* 2000;7:374–83
25. Coover D, Le TT, Morris GE, Thi Man N, Kralewski M, Sendtner M, Burghes AHM. Does the survival motor neuron protein (SMN) interact with Bcl-2? *J Med Genet* 2000;37:536–39
26. Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM, Jr, Snider WD, Korsmeyer SJ. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 1996;17:401–11
27. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997;3:614–20

Received July 18, 2002

Revision received December 18, 2002

Accepted December 19, 2002



## ANNEX DEL TREBALL 2

### Estudi de proteïnes de mort cel·lular a la medul·la espinal i al múscul esquelètic de fetus control i AME

#### Introducció

A rel del treball de Bcl-2 i Bcl-X a medul·la espinal fetal, vam poder analitzar l'expressió d'aquestes dues proteïnes al múscul esquelètic, fonamentalment a la regió paravertebral. La mort cel·lular programada durant el desenvolupament ha estat molt estudiada a gran quantitat de teixits, però existeix poca informació del múscul esquelètic. L'expressió de Bcl-2 i Bcl-X, en un estudi realitzat a múscul esquelètic de rata, es mostra constitutiva durant el desenvolupament postnatal, detectant-se un augment de l'expressió en el moment de màxima apoptosi (de Torres C *et al.*, 2002).

A part d'estudiar les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-X, ens vam plantejar analitzar l'expressió de la proteïna proapoptòtica Bax, tant a medul·la espinal com a múscul, en els mateixos individus analitzats anteriorment. Volíem intentar esbrinar quin era el mecanisme de mort neuronal en els fetus afectats per l'AME.

#### Material i mètodes

##### *Mostres fetals*

Per aquest estudi es van analitzar 8 fetus control de 12 (4) i 15 (4) setmanes de gestació i es van comparar amb 7 fetus amb AME tipus I de 12 (4) i 15 (3) setmanes, amb deleció homozigota dels exons 7 i 8 del gen *SMN*. Es van aïllar varies seccions de la medul·la espinal juntament amb les vèrtebres per tal d'obtenir també múscul paravertebral. Les mostres es van fixar en paraformaldehid al 4% per la posterior inclusió en parafina. Els talls de 5 µm i es van col·locar en portaobjectes tractats amb L-lisina al 50%.

##### *Immunohistoquímica*

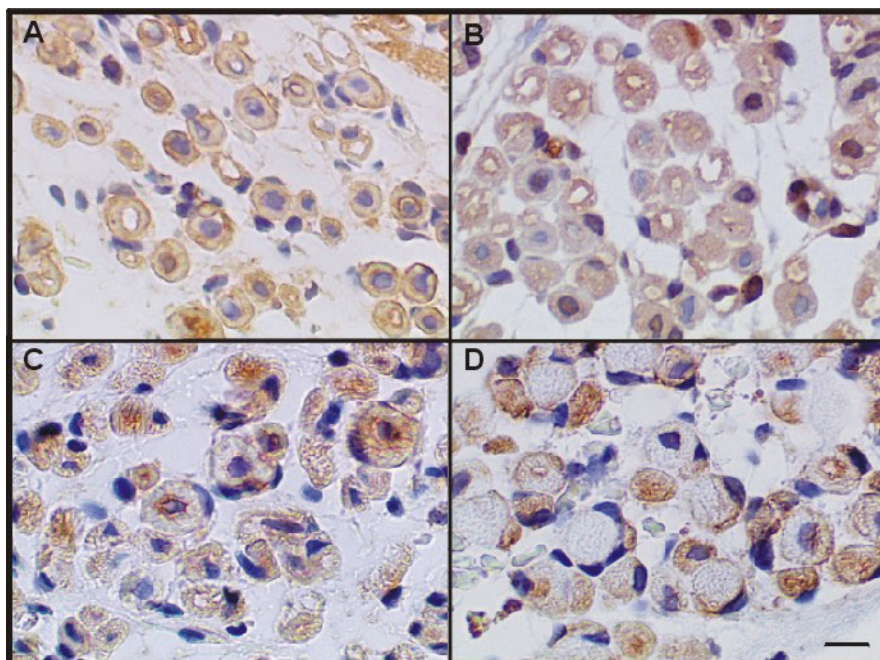
En primer lloc, es van desparafinar les mostres per tal de poder realitzar la immunohistoquímica, en la que es va utilitzar el mètode d'avidina-biotina-peroxidasa (ABC kit, Vectastain, Vector). Després de bloquejar les peroxidases internes amb peròxid d'hidrogen i metanol, es van tractar les seccions amb tampó citrat de sodi 10 mM pH6 durant 25 minuts a 100°C i es va deixar refredar tota la nit. Seguidament, es van bloquejar les seccions amb sèrum normal de cabra durant 2 hores a temperatura ambient (dilució 1:5). Després es van incubar amb els anticossos policlonals de conill Bcl-2 (N-19) (Santa



Cruz Biotechnology) a una dilució de 1:75, amb Bcl-X<sub>L</sub> (Transduction Laboratories) a una dilució de 1:500, i amb Bax (N-20) a una dilució 1:75 (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durant tota la nit. Com a control negatiu, es va preincubar l'anticòs anti-Bcl-2 (dilució 1:75) amb un excés de pèptid Bcl-2 (dilució 1:7,5) durant 1 hora a temperatura ambient, per després incubar les seccions amb l'anticòs preadsorbit. Al no disposar dels pèptids Bcl-X<sub>L</sub> i Bax, es van incubar les seccions amb la solució de bloqueig com a control negatiu. Després de les incubacions, les seccions van ser exposades a l'anticòs secundari biotinat durant 15 minuts, i finalment a l'estreptoavidina-peroxidasa també 15 minuts a temperatura ambient (HRP Rabbit/Mouse/Goat Universal LSB®+kit, DAKO). La reacció es va visualitzar amb diaminobenzidina al 0,05% (SIGMA) i peròxid d'hidrogen al 0,01%. Les seccions es va contratenyir lleugerament amb hematoxilina.

## Resultats

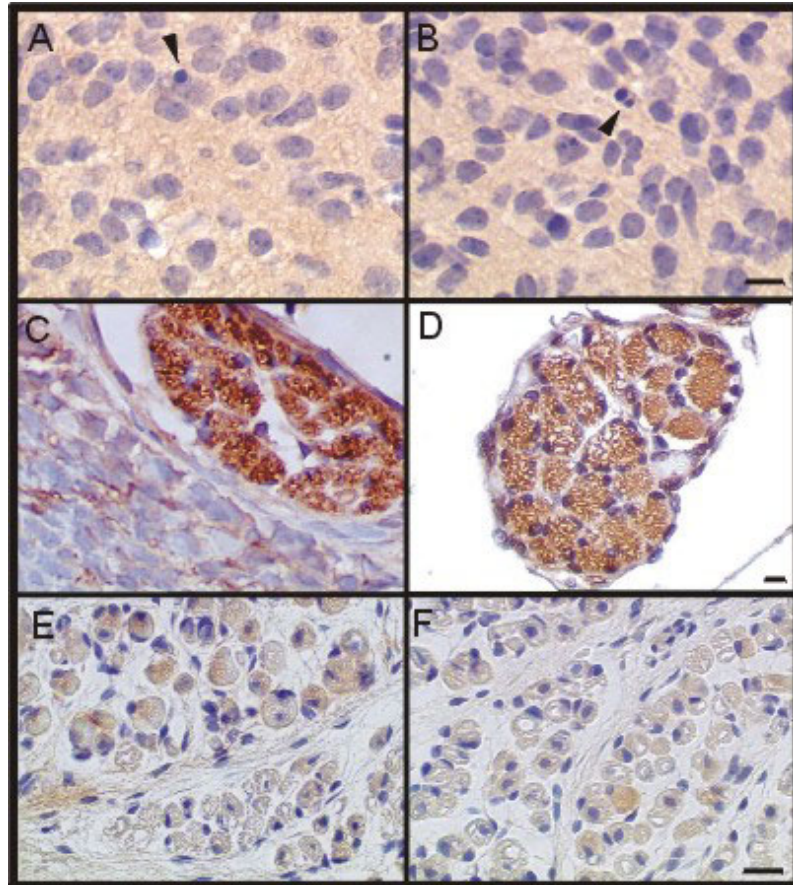
En analitzar l'immunoreactivitat de Bcl-2 i Bcl-X al múscul, vam detectar que ambdues proteïnes s'expressaven, però aparentment no vam trobar diferències entre els fetus control i els AME a les 12 i 15 setmanes de gestació (Figura 1). L'expressió era fonamentalment citoplasmàtica als miotubs i mioblasts. Aïlladament, algunes cèl·lules satèl·lit presentaven un senyal important. Cal destacar una expressió de Bcl-X més irregular.



**Figura 1.** Tall transversal de múscul de fetus control (A i C) i AME (B i D). Immunoreacció de Bcl-2 a fetus de 12 setmanes de gestació (A i B). Immunoreacció de Bcl-X a fetus de 15 setmanes de gestació (C i D). Escala: 10 µm.



En analitzar la medul·la espinal de fetus control i AME de 12 i 15 setmanes de gestació, vam observar que l'expressió de Bax era difusa a la majoria del teixit sense detectar-se una especificitat cel·lular (Figura 2, A i B). Curiosament, a tots els fetus tant control com AME, hi havia una elevada expressió de Bax als ganglis de les arrels dorsals i als nervis perifèrics (Figura 2, C i D). És important destacar però, que no existien diferències notables entre els control i els afectes.



**Figura 2.** Immunoreacció de Bax en fetus control (A, C i E) i en fetus AME (B, D i F) de 12 setmanes de gestació (A-D) i 15 setmanes de gestació (E i F). A i B: Banya anterior de la medul·la espinal. C i D: Nervi perifèric. E i F: Múscul esquelètic. Les fletxes indiquen cèl·lules amb morfologia apoptòtica. Escala: 10 µm.

Pel que fa a l'expressió de Bax al múscul, els resultats van ser similars als obtinguts amb Bcl-2 i Bcl-X, és a dir, no vàrem observar diferències significatives entre els fetus control i els AME (Figura 2, E i F).

